

536,802

10/536802

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年6月17日 (17.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/050868 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/47, 16/18,  
C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 38/17, 39/395, 48/00,  
A61P 31/12, 35/00, 37/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014854

(22) 国際出願日: 2003年11月20日 (20.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-349015

2002年11月29日 (29.11.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立  
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND  
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県  
川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 瀬谷 司

(SEYA, Tsukasa) [JP/JP]; 〒631-0022 奈良県 奈良市  
鶴舞西町2-10-E106 Nara (JP). 松本 美佐子  
(MATSUMOTO, Misako) [JP/JP]; 〒630-0121 奈良県  
生駒市 北大和2丁目20-7 Nara (JP). 押海 裕之  
(OSHIUMI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒544-0024 大阪府 大阪  
市 生野区生野西4-3-17 Osaka (JP).(74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒530-0041 大阪府 大  
阪市 北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル  
原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (DE, FR, GB, IT).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL ADAPTOR PROTEIN BINDING TO MAMMALIAN TOLL-LIKE RECEPTOR 3 AND GENE THEREOF

(54) 発明の名称: 哺乳動物のToll様受容体3に結合する新規アダプタータンパク質およびその遺伝子

(57) Abstract: It is intended to provide a novel adaptor protein efficacious in preventing and treating viral infections such as hepatitis B and hepatitis C and treating tumor, etc. which controls the production of I-type interferon and binds to mammalian Toll-like receptor 3, and its gene. A novel adaptor protein TICAM-1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 or 4, binding specifically to mammalian Toll-like receptor 3 and inducing the production of I-type interferon. A mutant of the above adaptor protein TICAM-1 has the same properties, so long as it carries a TIR domain (an amino acid sequences ranging from the 394-position to the 532-position in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 or an amino acid sequences ranging from the 396-position to the 534-position in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4). A gene encoding the above adaptor protein TICAM-1.

(57) 要約: B型肝炎やC型肝炎等のウイルス感染症等の予防・治療、腫瘍の治療等に有効なI型インターフェロンの産生を制御する、哺乳動物のToll様受容体3に結合する性質を持つ新規アダプタータンパク質およびその遺伝子を提供する。新規アダプタータンパク質TICAM-1は、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列からなり、哺乳動物のToll様受容体3に対して特異的に結合する性質と、I型インターフェロンの産生を誘導する性質とを併せ持つ。上記アダプタータンパク質TICAM-1の変異体は、TIRドメイン (配列番号2に示されるアミノ酸配列のうち394~532番目のアミノ酸配列または配列番号4に示されるアミノ酸配列のうち396~534番目のアミノ酸配列) を有していれば、同様の性質を持つ。また、遺伝子は、アダプタータンパク質TICAM-1をコードする遺伝子である。

WO 2004/050868 A1

## 明 細 書

哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に結合する新規アダプタータンパク質およびその遺伝子

## 技術分野

- 5       本発明は、哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に結合して I 型インターフェロンの産生を誘導しうる性質を持つ新規アダプタータンパク質およびその変異体、並びにそれをコードする遺伝子、その用途に関するものである。

## 10   背景技術

インターフェロンは、ウイルスに対する適応免疫応答において重要な役割を果たすタンパク質である。

- 15       前述したように、インターフェロンは、適応免疫系において重要な役割を果たしており、適応免疫系におけるインターフェロンの役割については詳細な研究がなされている。しかしながら、病原体に対する免疫応答の際に、生体内でインターフェロンがどのようなシグナル伝達経路を介して産生されるかについてはほとんど解明されていなかった。

- 20       最近、哺乳動物の自然免疫系において病原体を認識する受容体として T o l l 様受容体 (Toll-like Receptor; 以下、適宜「TLR」と略記する) が発見され、この TLR に関する研究により、自然免疫系における病原体の認識に係わるシグナル伝達経路が明らかにされつつある。

哺乳動物の TLR ファミリーは、ショウジョウバエとヒトとの種の違

いを越えて保存されていると考えられる主要な組織であり、様々な微生物構成成分を認識し、核因子 $\kappa$ B（以下、「NF- $\kappa$ B」と略記する）の活性化および他のシグナル伝達経路を媒介する。

現在、ヒトでは、TLRファミリーに属する10種の受容体（ヒトTLR1～10）が確認されており、これらのマウス相同体（マウスTLR1～10）も確認されている。TLRファミリータンパク質は、複数のロイシン・リッチ・リピート（LRR）およびそれとカルボキシル末端（C末端）隣接領域を含む細胞外領域と、Toll／インターロイキン1受容体相同ドメイン（TIR）と呼ばれる細胞質の（細胞内の）シグナル伝達領域とから構成されている。各TLRは、特有の1種または複数種のリガンドを細胞外領域で認識し、細胞内のTIRを媒介すると推測される免疫応答を誘発する。各TLRによって誘発される免疫応答は、互いに異なっており、一部が重複していることもある。

ほとんどのTLRファミリーのタンパク質に共通する細胞質領域のTIRドメインは、シグナル伝達およびアダプター分子MyD88またはMal／TIRAPの相互作用を引き起こすと考えられている。すなわち、TLR2、TLR4、TLR5、TLR7、およびTLR9は、アゴニスト刺激の下でアダプター分子MyD88によってシグナルを伝達してNF- $\kappa$ Bを活性化する。

一方、最近、TLR4を介するシグナル伝達経路においては、TLR4と会合するアダプター分子Mal／TIRAP（MyD88-adaptor-likeあるいはTIRAPと呼ばれているアダプター分子）が関与していることが報告されている（例えば、文献1：Kawai, T., et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent path

way and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. J. Immunol. 167: 5887-5894 (2001)、文献 2 : Horng, T., Barton, G. M., & Medzhitov, R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. Nat. Immunol. 2: 835-841 (2001)および文献 3 : Fitzgerald, K. A., et al. Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. Nature 413: 78-83 (2001) 参照)。

上記の報告によれば、TLR 4 は、NF- $\kappa$ B、MAPK、およびインターフェロン  $\beta$  プロモータの活性化に参与している。このインターフェロン  $\beta$  プロモータの活性化を誘導する TLR 4 の特有の能力は、「アダプター分子 MyD88 に非依存的なシグナル伝達経路」と呼ばれている、TLR 4 と会合するアダプター分子 Mal / TIRAP によって媒介されるシグナル伝達経路に起因している。すなわち、TLR 4 を介するシグナル伝達では、アダプター分子 MyD88 と異なる第 2 のアダプター分子 Mal / TIRAP と TLR 4 との協働によって、NF- $\kappa$ B および I 型インターフェロンプロモータの活性化が制御される。

マクロファージ (Mf) においては、TLR 2 刺激ではなく TLR 4 刺激の結果として、インターフェロン  $\beta$  のプロモータ活性化が STAT 1 による  $\alpha$  /  $\beta$  リン酸化を誘導する。その後、インターフェロン  $\beta$  をコードしている遺伝子の発現は、MCP (Monocyte Chemoattractant Protein)-5、IP (インターフェロン誘導タンパク質)-10、および iNOS (誘導型 NO 合成酵素) の産生を誘導する。これは、再びアダプター分子 MyD88 に非依存的な経路を介して起こり、MyD88-

ー細胞（アダプター分子MyD88を欠損させた細胞）でさえ起こる。

現在まで最も可能性が高いと思われていた概念は、アダプター分子Mal/TIRAPがアダプター分子MyD88に非依存的な経路をカバーするということである。

- 5       これに対して、本願発明者等は、二本鎖RNAによって誘導されヒトTLR3を介した免疫応答を研究し、ヒトの線維芽細胞において、ヒトTLR3が、細胞表面上での二本鎖RNAの認識に関与し、インターフェロン $\beta$ 産生を誘導する下流のシグナル伝達を引き起こすことを見出した（例えば、文献4：Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., & Seya, T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293: 1364-1369（2002年5月31日電子発行）参照）。すなわち、インターフェロン $\beta$ プロモータの活性化およびインターフェロン $\beta$ の産生が、二本鎖RNAに応答したヒトTLR3によって強くかつ急速に誘導されることを示した（例えば、文献4参照）。ヒトTLR3は、二本鎖RNAの類似体であるポリ（I：C）にも応答してNF- $\kappa$ Bおよびインターフェロン $\beta$ プロモーターを活性化させる（例えば、文献4参照）。リポーター遺伝子分析により、ヒトTLR3は、インターフェロン $\beta$ プロモータの活性化を媒介するが、NF- $\kappa$ Bの活性化はそれより低いレベルでしか媒介しないことが明らかになった（例えば、文献4参照）。この結果は、他のTLR、TLR2、TLR5、TLR7、およびTLR9が、それらに特有のリガンドを認識したのに続いて、アダプター分子MyD88を介してNF- $\kappa$ Bおよびp38 MAPK（MAPキナーゼ）を活性
- 10
- 15
- 20

化したのと著しく異なっている。

ところで、TLR3によって誘導されるI型インターフェロン（インターフェロン $\alpha$ およびインターフェロン $\beta$ ）は、抗ウイルス作用や抗がん作用を示すことが知られている。詳細には、I型インターフェロンは、  
5 以下のような作用を持つことが知られている。

I型インターフェロンは、以下のような複数の作用機序により抗ウイルス作用を奏することが知られている。

①ウイルスのmRNAを不安定化し、宿主のタンパク翻訳を抑制する細胞内遺伝子を活性化する。これにより、ウイルスの複製を抑制し、ウイルスの増殖を抑制する。  
10

②MHCクラスI分子の発現を誘導し、ナチュラルキラー（NK）細胞に対する抵抗性を誘導する。細胞障害性CD8+T細胞に対する感受性を亢進させる。さらに、T細胞の活性化の抑制およびT細胞サプレッサー活性の増強にも関与する。

③ウイルス感染細胞を選択的に障害するナチュラルキラー（NK）細胞を活性化し、ナチュラルキラー（NK）細胞によるアポトーシスをウイルスに誘導する。  
15

また、I型インターフェロンは、以下のような複数の作用機序により抗腫瘍作用を奏することが知られている。

1）腫瘍細胞内のmRNAを不安定化し、宿主のタンパク翻訳を抑制する細胞内遺伝子を活性化する。これにより、腫瘍細胞内のタンパク質の合成を抑制し、腫瘍細胞の増殖を抑制する。  
20

2）マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞等の抗腫瘍エフェクターを活性化し、これらの抗

腫瘍エフェクターにより腫瘍細胞を障害することで、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する。

3) ウイルス感染細胞を選択的に障害するナチュラルキラー (NK) 細胞を活性化し、ナチュラルキラー (NK) 細胞によるアポトーシスを腫瘍細胞に誘導する。

さらに、I 型インターフェロンは、前述したように T 細胞の活性化の抑制、T 細胞サプレッサー活性の増強にも関与することから、ある種の自己免疫疾患を改善できると考えられる。

I 型インターフェロンは、以上のような抗ウイルス作用および抗腫瘍作用を持つことから、従来より、インターフェロン  $\alpha$  製剤やインターフェロン  $\beta$  製剤が、B 型肝炎、C 型肝炎、C 型肝炎から誘発される肝がん、腎臓がん等の治療剤として使用されている。例えば、天然型インターフェロン  $\alpha$  製剤である住友製薬株式会社製の「スミフェロン (登録商標)」などが、臨床応用において好成績を挙げている。

しかしながら、これまでの TLR に関する研究では、二本鎖 RNA を認識した TLR 3 により I 型インターフェロンの産生が誘導されるシグナル伝達経路が、他の TLR を介したシグナル伝達経路とは異なることが示唆されているものの、このシグナル伝達経路に関与するタンパク質は解明されていない。

もし TLR 3 と特異的に結合して下流の I 型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を誘導するタンパク質の存在が明らかにされれば、ウイルスに対する自然免疫応答における重要なシグナル伝達経路およびその調節機構の解明が進むこととなり、自然免疫系に係わる種々の病気の病態解析や、自然免疫応答の調節による治療薬の開発等に有効利用で

きると考えられる。

また、前述したウイルス感染症や腫瘍の治療に用いられているインターフェロン製剤は、全身投与なので、治療効果の得られる濃度では、精神・神経症状（うつ病等）、自己免疫疾患（甲状腺機能異常、自己免疫性  
5 肝炎、溶血性貧血、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ等）が悪化する等の副作用が強い。インターフェロン製剤による副作用は、本来はインターフェロンを産生しない正常な宿主細胞にまでインターフェロンが導入されてしまうために、本来は外部抗原に対する免疫応答時に行われるべきT細胞に対する自己抗原の提示が、インターフェロンの導入部位全体  
10 で誘導され、自己免疫現象が起こり易くなるためであると考えられる。

このように、インターフェロン製剤は、治療効果の得られる濃度では副作用が強いため、全身投与では十分な抗がん作用を維持するのが難しい。また、インターフェロン製剤を局所投与したとしても、副作用を完全に避けることは難しいと考えられる。

もしTLR3と特異的に結合して下流のI型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を誘導する新規なタンパク質を見出せば、生体内で局所的なI型インターフェロンの産生を亢進することによりウイルス感染症や腫瘍等进行治疗する新たな治療剤を開発することができると考えられる。また、この新規なタンパク質の機能解析を通じて生体内でI型  
15 インターフェロンの産生を阻害するタンパク質を提供し、このタンパク質により生体内でI型インターフェロンの産生を阻害することにより自己免疫疾患やアトピー性疾患等进行治疗する新たな治療剤を提供することができると考えられる。

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、哺乳



動物の T o 1 1 様受容体 3 に特異的に結合する性質を持つ新規アダプタータンパク質およびその変異体、上記タンパク質の遺伝子、上記遺伝子を含む組換え発現ベクター、上記タンパク質に対する抗体、並びにこれらを用いたウイルス感染症の予防・治療剤、腫瘍の治療剤、自己免疫疾患の治療剤、およびアトピー性疾患の治療剤を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者は、上記の課題に鑑み、本発明を完成させるに至った。

本願発明者等は、最近、ヒト T L R 3 が、現在知られている T L R ファミリー全般のシグナル伝達に必須と考えられているアダプター分子 M y D 8 8、および T L R 4 に会合するアダプター分子 M a 1 / T I R A P に依存することなく、二本鎖 R N A (リボ核酸) の存在を示すシグナルを伝達してインターフェロン ( I F N )  $\beta$  の産生を誘導することを見出した。

本願発明者は、哺乳動物の T o 1 1 様受容体 3 に特異的に結合する性質を持つ新規アダプタータンパク質について鋭意検討した結果、哺乳動物の T o 1 1 様受容体 3 に特異的に結合する性質を持つ新規アダプタータンパク質を同定するとともに、その全長遺伝子配列を決定し、さらに、この新規タンパク質が、核因子を活性化しインターフェロン  $\beta$  の産生を誘導する機能を持つことを見出し、本発明を完成させるに至った。

本発明に係るタンパク質は、配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその変異体である。

上記タンパク質は、後述するように、本願発明者等が初めて同定し、その全長アミノ酸配列を明らかにした新規のアダプタータンパク質 (本

願発明者等はこれを「T I C A M-1」と命名した；以下、適宜「アダプタータンパク質 T I C A M-1」と記す）であり、配列番号 2 にはヒト由来のアミノ酸配列を、配列番号 4 にはマウス由来のアミノ酸配列をそれぞれ示す。このアダプタータンパク質 T I C A M-1 は、後述するように、他の T L R や T L R 3 変異体等とは結合せず T L R 3 と特異的に結合し、哺乳動物の核因子  $\kappa$  B (N F -  $\kappa$  B) およびインターフェロン  $\beta$  プロモータを活性化し、インターフェロン  $\beta$  の産生を誘導する機能を持つことが確認された。

したがって、上記タンパク質は、哺乳動物の I 型インターフェロンの産生を亢進することができる。それゆえ、前述した I 型インターフェロンの抗ウイルス作用や抗腫瘍作用を利用して、B 型肝炎や C 型肝炎等のウイルス感染症等の予防・治療（予防または治療）、腫瘍（がん）の自然免疫治療等が可能となる。

すなわち、ウイルス感染症の殆どでウイルスの二本鎖 R N A が関与することが証明されており、この二本鎖 R N A は、T L R 3 によって認識され、T I C A M-1 を介したシグナル伝達経路により I 型インターフェロンの産生を誘導する。したがって、ウイルス感染症に対してアダプタータンパク質 T I C A M-1 を投与すれば、ウイルス感染症に対する自然免疫系の免疫応答を増強し、ウイルス感染部位において選択的に I 型インターフェロンを大量に産生させることができる。それゆえ、ウイルス非感染部位に対する I 型インターフェロンの導入によって引き起こされる自己免疫疾患等の副作用を回避しながら、I 型インターフェロンの抗ウイルス作用によりウイルス感染症を予防または治療することができる。

また、アダプタータンパク質 T I C A M - 1 は、後述するように、T L R 3 と会合しなくとも、単独で I 型インターフェロンの産生を誘導することが確認された。したがって、アダプタータンパク質 T I C A M - 1 は、ウイルス感染時以外にも I 型インターフェロンの産生を誘導でき、I 型インターフェロンの産生により改善される各種の疾患に有効である。例えば、腫瘍に対してアダプタータンパク質 T I C A M - 1 を投与すれば、I 型インターフェロンの産生を誘導することができるので、I 型インターフェロンの抗腫瘍作用を利用して腫瘍の治療が可能となる。

また、上記タンパク質は、アダプター分子 M y D 8 8 および M a l / T I R A P に非依存的な T L R 3 を介する新たなシグナル伝達経路が存在することを明らかにするものであり、この新たなシグナル伝達経路により、T L R ファミリーからインターフェロン  $\beta$  プロモーターの活性化に至るシグナル伝達のミッシングリンクが説明可能となる。そのため、タンパク質は、上記 T L R 3 を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析に有効利用できる可能性がある。

なお、上記タンパク質が、インターフェロン  $\alpha$  の産生を誘導する機能を持つかは検証されていないが、これまでの研究によりインターフェロン  $\alpha$  およびインターフェロン  $\beta$  の産生に係るシグナル伝達経路が共通していることが確認されていることから、上記タンパク質は、インターフェロン  $\alpha$  の産生を誘導する機能も持っていると推定される。

ここで、上記「タンパク質」は、細胞、組織などから単離精製された状態であってもよいし、タンパク質をコードする遺伝子を宿主細胞に導

入して、そのタンパク質を細胞内発現させた状態であってもよい。また、本発明に係るタンパク質は、付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。このようなポリペプチドが付加される場合としては、例えば、H AやF l a g 等によって本発明のタンパク質がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。

本発明に係る配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の変異体は、配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるものであって、( a ) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のうち 3 9 4 ~ 5 3 2 番目のアミノ酸配列 ( T I R ドメイン ) を有するもの、( b ) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列のうち 3 9 6 ~ 5 3 4 番目のアミノ酸配列 ( T I R ドメイン ) を有するもの、( c ) 哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に対して特異的に結合する性質と、哺乳動物の I 型インターフェロンの産生を誘導する性質とを併せ持つもの、( d ) 哺乳動物の I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を持つ一方、哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に対して特異的に結合する性質に異常 ( 低下あるいは欠失 ) を持つもの、または ( e ) 哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に対して特異的に結合する性質を持つ一方、哺乳動物の I 型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つものである。上記 ( e ) のタンパク質の具体例としては、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、少なくとも 4 3 4 番目のアミノ酸が置換又は欠失され、かつ、3 9 4 ~ 5 3 2 番目のアミノ酸配列 ( T I R ドメイン ) の少なくとも一部を保持しているヒト由来のタンパク質が挙げられる。

上記タンパク質の変異体は、上記 T L R 3 を介したシグナル伝達系な

らびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析に有効利用できる可能性がある。

さらに、上記（a）～（c）の変異タンパク質は、上記配列番号2または4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と同様に、哺乳動物のI型インターフェロンの産生を亢進することができる。それゆえ、前述したI型インターフェロンの抗ウイルス作用や抗腫瘍作用を利用して、B型肝炎やC型肝炎等のウイルス感染症等の予防・治療（予防または治療）、腫瘍（がん）の自然免疫治療等が可能となる。

上記（d）の変異タンパク質は、哺乳動物のI型インターフェロンの産生を亢進することができるので、I型インターフェロンの産生を亢進することによって改善される疾患（がんやウイルス感染症等）の予防または治療のための治療剤として使用することができる。

上記（e）の変異タンパク質は、TLR3に結合してTLR3からI型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を阻害するので、哺乳動物のI型インターフェロンの産生を抑制することができる。それゆえ、それゆえ、I型インターフェロンの産生によって引き起こされる自己免疫疾患やアレルギー性疾患等の疾患の予防または治療に使用できると考えられる。

また、上記（a）～（e）の変異タンパク質は、例えば、野生型タンパク質と構造を比較することにより、その構造の中で活性に必須な領域が明らかになるという、タンパク質の機能解析においても有用である。

なお、上記「1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク

質作製法により置換、欠失、挿入、及び／又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されることを意義する。換言すれば、配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列の 1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるものとは、配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質を変異した変異体（変異タンパク質）である。ここにいう「変異」は、主として公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然に存在する同様の変異タンパク質を単離精製したものであってもよい。

10 本発明に係る遺伝子は、上記タンパク質のいずれかをコードする遺伝子である。

上記遺伝子は、上記 T L R 3 を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析に有効利用できる可能性がある。

15 なお、上記「遺伝子」とは、少なくともゲノム DNA、c DNA、m RNA を含む意味であり、本発明に係る遺伝子としては、①配列番号 1 に示される塩基配列のうち、63～2198 番目の塩基配列をオープンリーディングフレームとして有するヒト由来の c DNA、②配列番号 3  
20 に示される塩基配列のうち、66～2261 番目の塩基配列をオープンリーディングフレームとして有するマウス由来の c DNA、③これら c DNA の塩基配列に対応する塩基配列を有する m RNA が例として挙げられる。

また、上記「遺伝子」とは、2 本鎖 DNA のみならず、それを構成す

るセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各 1 本鎖 DNA や RNA を包含する。さらに、上記「遺伝子」は、オープンリーディングフレーム以外に、非翻訳領域（UTR）の配列やベクター配列（発現ベクター配列を含む）などの配列を含むものであってもよい。例えば、タンパク質をコードする配列をベクター配列につないで本発明の遺伝子を構成し、これを適当な宿主で増幅させることにより、本発明の遺伝子を所望に増幅させることができる。また、本発明の遺伝子の一部配列をプローブに用いてもよい。このようにプローブに用いる場合としては、例えば、本発明の遺伝子の一部配列をチップ上に固定して DNA チップを構成し、当該 DNA チップを各種検査・診断用に用いるような場合が挙げられる。

本発明に係る組換え発現ベクターは、上記遺伝子を含むものである。

この組換え発現ベクターを用いると、公知の遺伝子工学的手法（遺伝子操作技術）により標的細胞を形質転換して標的細胞に上記遺伝子を導入することができる。

上記形質転換により得られる形質転換体は、上記 TLR 3 を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析に有効利用できる可能性がある。

また、上記形質転換によって、この組換え発現ベクターに含まれる遺伝子を哺乳動物の標的細胞（宿主細胞）内に導入し、その細胞内で発現させることで、哺乳動物の I 型インターフェロンの産生を制御することができる。それゆえ、上記組換え発現ベクターは、I 型インターフェロンの産生を亢進することによって改善される疾患（ウイルス感染症や腫

瘍等)、あるいは I 型インターフェロンの産生によって引き起こされる疾患の遺伝子治療が可能となる。

本発明に係る抗体は、上記タンパク質に特異的に結合する抗体である。

5      上記抗体は、宿主細胞におけるアダプタータンパク質 T I C A M - 1 の発現の検出、アダプタータンパク質 T I C A M - 1 の製造・精製等に有用であると考えられる。

10      また、上記抗体は、哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に対して特異的に結合する性質を持つタンパク質に対して特異的に結合する抗体は、哺乳動物の T o l l 様受容体 3 を介した免疫応答による I 型インターフェロンの産生を阻害することができる。I 型インターフェロンの産生を亢進することによって改善される疾患（ウイルス感染症や腫瘍等）の予防・治療剤として有効である。

15      本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるだろう。

#### 図面の簡単な説明

20      図 1 ( a ) ~ 図 1 ( d ) は、ヒト T L R による N F -  $\kappa$  B の活性化をリポーター遺伝子発現アッセイにより解析した結果を示す図である。

図 2 ( a ) ~ 図 2 ( d ) は、ヒト T L R によるインターフェロン  $\beta$  プロモーターの活性化をリポーター遺伝子発現アッセイにより解析した結果を示す図である。

図 3 ( a ) は、ヒト T L R 3 およびその変異体による N F -  $\kappa$  B の活



性化をリポーター遺伝子発現アッセイにより解析した結果を示す図であり、図 3 (b) は、ヒト TLR 3 およびその変異体によるインターフェロン  $\beta$  プロモーターの活性化をリポーター遺伝子発現アッセイにより解析した結果を示す図である。

5 図 4 は、酵母ツー・ハイブリッド・システムによるタンパク間の相互作用を調べた結果を示す図である。

図 5 は、ヒト TICAM-1 とマウス TICAM-1 との相同性検索の結果を示す図である。

10 図 6 は、ヒト TICAM-1 およびマウス TICAM-1 と、既知のアダプター分子 Mal および MyD88 の TIR ドメインを示す図である。

図 7 は、ヒトの多数の組織中における TICAM-1 の mRNA の発現を示す図である。

15 図 8 は、RT-PCR により複数種のヒト細胞およびヒト細胞株における TICAM-1 の mRNA を検出した結果を示す図である。

図 9 は、ヒト TICAM-1 とヒト TLR 3 の相互作用を解析するための免疫沈降法の結果を示す図である。

20 図 10 は、ヒト TICAM-1 と、ヒト TLR 3 以外のヒト TLR やヒト TLR 3 変異体との相互作用を解析するための免疫沈降法の結果を示す図である。

図 11 は、ヒト TICAM-1 の変異体を示す図である。

図 12 (a) は、ヒト TICAM-1 およびその変異体について、インターフェロン  $\beta$  プロモーター活性の測定結果を示す図であり、図 12 (b) は、ヒト TICAM-1 およびその変異体について、NF- $\kappa$ B

活性の測定結果を示す図である。

図 1 3 ( a ) は、T L R 3 によって媒介されるシグナル伝達を解析するためのリポーター遺伝子発現アッセイによるインターフェロン  $\beta$  活性の測定結果を示す図であり、図 1 3 ( b ) は、T L R 3 によって媒介されるシグナル伝達を解析するためのリポーター遺伝子発現アッセイによる N F -  $\kappa$  B 活性の測定結果を示す図である。

図 1 4 ( a ) は、ヒト T I C A M - 1 および既知のアダプター分子についてインターフェロン  $\beta$  活性を測定した結果を示す図であり、図 1 4 ( b ) は、ヒト T I C A M - 1 および既知のアダプター分子について N F -  $\kappa$  B 活性を測定した結果を示す図である。

図 1 5 は、H E K 2 9 3 細胞中におけるヒト T I C A M - 1 および既知のアダプター分子の発現を示すウエスタンブロットの結果を示す図である。

図 1 6 は、ヒト T I C A M - 1 の一本鎖 R N A の配列を示す図である。

図 1 7 ( a )、図 1 7 ( b ) は、R T - P C R 分析の結果を示す図である。

図 1 8 ( a )、図 1 8 ( b ) は、R N A i による解析結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の実施の一形態について説明すれば、以下の通りである。なお、本発明は、これに限定されるものではない。

( 1 ) 本発明に係るアダプタータンパク質 T I C A M - 1、及びその

## 遺伝子の配列、構造等

本願発明者等は、〔実施例〕で述べるHEK293細胞のトランスフェクトの実験によって、二本鎖RNAによって誘導されるヒトTLR3を介したTLR3シグナル伝達は、その細胞質の末端であるTIRドメインを通して行われ、主としてアダプター分子MyD88およびMal/TIRAPに非依存的事であることを見出した。

そこで、本願発明者等は、少なくともTLR3を介するI型インターフェロンプロモーターの活性化には別のアダプター分子が優先的に関与していると考えた。

本願発明者等は、I型インターフェロンの産生を誘導するシグナル伝達を優先的に媒介する、既知のアダプター分子MyD88およびMal/TIRAPとは異なる別のアダプター分子が存在するはずと考え、この未知のアダプター分子の同定を試みた。

その結果、本願発明者等は、物理的にはヒトTLR3のToll/インターロイキン1受容体相同ドメイン（以下、「TIRドメイン」と略記する）と結合し、機能的にはポリイノシン酸-シチジル酸（以下、「ポリ（I：C）」と略記する）に応答してI型インターフェロンプロモーターの活性化を誘導する代替のアダプター分子を同定することに成功した。このアダプター分子は、TIRドメインを含有することから、本願発明者等は、「TIRドメイン含有アダプター分子」（以下、「TICAM-1」と略記する）と命名した。

本発明に係るアダプタータンパク質TICAM-1のアミノ酸配列を、配列番号2および4に示す。配列番号2にはヒト由来のアダプタータンパク質TICAM-1（以下、「ヒトTICAM-1」と略記する）

のアミノ酸配列を、配列番号4にはマウス由来のアダプタータンパク質 T I C A M-1 (以下、「マウス T I C A M-1」と略記する)をそれぞれ示す。

また、上記アダプタータンパク質 T I C A M-1 をコードする完全長  
5 c D N A 配列の塩基配列を、配列番号1および3に示す。配列番号1にはヒト T I C A M-1 をコードする c D N A の塩基配列を、配列番号3にはマウス T I C A M-1 をコードする c D N A の塩基配列をそれぞれ示す。

なお、配列番号1の塩基配列中、63～2198番目の塩基配列が、  
10 ヒト T I C A M-1 をコードするオープンリーディングフレーム (O R F) 領域に相当する。また、配列番号3の塩基配列中、66～2261番目の塩基配列が、上記マウス T I C A M-1 をコードするオープンリーディングフレーム (O R F) 領域に相当する。配列番号1および3に示される各 c D N A 配列は、この O R F 領域のほか5'側及び3'側に  
15 それぞれ非翻訳領域 (U T R) を含むものであった。

ヒト T I C A M-1 は、N末端のプロリン・リッチ・ドメイン (1～  
393番目のアミノ酸配列)、T I R ドメイン (394～532番目の  
アミノ酸配列)、およびC末端のプロリン・リッチ・ドメイン (533  
～712番目のアミノ酸配列) から構成されていることが判明した (図  
20 5)。

ヒト T I C A M-1 の c D N A 配列の T I R ドメインは、既知のアダ  
プター分子、ヒト M a l / T I R A P (非特許文献3・4参照)およびヒ  
ト M y D 8 8 の T I R ドメイン (図6の「M a l (T I R) . h u」お  
よび「M y D 8 8 (T I R) . h u」) に対する類似性が低く、他の T

I R ドメイン含有タンパク質の T I R ドメイン中における保存配列である、B o x 1 の ( F / Y ) D 、 B o x 2 の R D 、 および B o x 3 の F W ( Xu, Y, et al. Structural basis for signal transduction by the T oll/interleukin-1 receptor domains, Nature 408: 111-115 (2000) 参照 ) が全て欠失している点で特異的である ( 図 6 ) 。

対照的に、ヒト T I C A M - 1 では、T I R - M y D 8 8 を介するシグナル伝達に必須であり、既知のアダプター分子 M y D 8 8 および M a l / T I R A P で保存されている、いわゆる B B ループ ( Xu, Y, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains, Nature 408: 111-115 (2000) 参照 ) 内のプロリンが良く保存されていた。

このヒト T I C A M - 1 と既知のアダプター分子 M y D 8 8 および M a l / T I R A P との間のもう 1 つの重要な相違点は、ヒト T I C A M - 1 は、D e a t h 領域 ( 細胞死誘導領域 ) 、あるいはより短い M a l に類似した N 末端ドメインが欠失しており、その代わりに、プロリン・リッチな長い N 末端領域および C 末端領域を含んでいる点である。

また、上記ヒト T I C A M - 1 の c D N A 配列を用いて、ヒトゲノムドラフトシーケンスのデータベース検索を行った。その結果、ヒト T I C A M - 1 をコードする c D N A 配列は、染色体 1 9 p 1 3 . 3 ( 遺伝子座 ) 上に存在することが判明した。

なお、上記タンパク質や遺伝子は、診断にも利用できる可能性がある。すなわち、診断対象の個体から採取した細胞においてアダプタータンパク質 T I C A M - 1 または同様の機能を持つ変異体の発現の有無を検出すれば、この結果に基づいて個体がアダプタータンパク質 T I C A M

ー 1 の欠損や変異に起因する免疫不全症にかかっているか否かを診断することができると考えられる。アダプタータンパク質 T I C A M - 1 または同様の機能を持つ変異体の発現の有無を検出する方法としては、D N A チップを用いてアダプタータンパク質 T I C A M - 1 の遺伝子を検出する方法、個体のアダプタータンパク質の遺伝子における一塩基多型 ( S N P s ) を調べる方法等が考えられる。

## ( 2 ) 本発明に係るタンパク質、遺伝子の取得方法

本発明に係るタンパク質および遺伝子の取得方法について説明する。

上記アダプタータンパク質 T I C A M - 1 をコードする遺伝子を取得する方法は、特に限定されるものではなく、前述の開示された配列情報等に基づいて種々の方法により、上記遺伝子配列を含む D N A 断片を単離し、クローニングすることができる。例えば、上記アダプタータンパク質 T I C A M - 1 をコードする c D N A の一部配列と特異的にハイブリダイズするプローブを調製し、ヒトまたはマウスのゲノム D N A ライブラリーや c D N A ライブラリーをスクリーニングすればよい。このようなプローブとしては、上記アダプタータンパク質 T I C A M - 1 をコードする c D N A の塩基配列又はその相補配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブであれば、いずれの配列・長さのものを用いてもよい。また、上記スクリーニングにおける各ステップについては、通常用いられる条件の下で行えばよい。

上記スクリーニングによって得られたクローンは、制限酵素地図の作成及びその塩基配列決定 ( シークエンシング ) によって、さらに詳しく解析することができる。これらの解析によって、本発明に係る遺伝子配列を含む D N A 断片を取得したか容易に確認することができる。

また、上記プローブの配列を、上記アダプタータンパク質 T I C A M  
ー 1 の機能上重要と考えられる T I R ドメインの中から選択し、ヒト・  
マウスやその他の哺乳動物の c D N A ライブラリーをスクリーニングす  
れば、上記アダプタータンパク質 T I C A M ー 1 と同様の機能を有する  
5 相同分子や類縁分子をコードする遺伝子を単離しクローニングできる。

本発明に係る遺伝子（ポリヌクレオチド）を取得する方法は、上記ス  
クリーニング法以外にも、P C R 等の増幅手段を用いる方法がある。例  
えば、上記アダプタータンパク質 T I C A M ー 1 の c D N A 配列のうち  
、5' 側及び 3' 側の非翻訳領域の配列（又はその相補配列）の中から  
10 それぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてヒト・マウス  
のゲノム D N A（又は c D N A）等を鋳型にして P C R 等を行い、両プ  
ライマー間に挟まれる D N A 領域を増幅することで、本発明のポリヌク  
レオチドを含む D N A 断片を大量に取得できる。

本発明に係るタンパク質を取得する方法についても、特に限定される  
15 ものではなく、例えば、上述のようにして取得された遺伝子（上記アダ  
プタータンパク質 T I C A M ー 1 又はその相同分子等をコードする c D  
N A 等）を、周知の方法により大腸菌や酵母等の微生物又は動物細胞な  
どに組み入れ、その c D N A がコードするタンパク質を発現させ精製す  
ることで、上記タンパク質アダプタータンパク質 T I C A M ー 1 等の本  
20 発明に係るタンパク質を容易に取得することができる。尚、このように  
宿主に外来遺伝子を導入する場合、外来遺伝子の組換え領域に宿主内で  
機能するプロモータを組み入れた組換え発現ベクター及び宿主には様々  
なものがあるので、目的に応じたものを選択すればよい。産生されたタ  
ンパク質を取り出す方法は、用いた宿主、タンパク質の性質によって異

なるが、タグの利用等により比較的容易に目的のタンパク質を精製することが可能である。

(3) アダプタータンパク質 T I C A M-1 及びその遺伝子等の有用性

5       アダプタータンパク質 T I C A M-1 は、以下の 2 種類の作用機序により、I 型インターフェロンの産生を亢進することができる。

10       (a) ウイルスに感染した、T L R 3 を発現している宿主細胞内で、アダプタータンパク質 T I C A M-1 が、ウイルス由来の二本鎖 R N A を認識した T L R 3 と結合して、下流の I 型インターフェロンの産生誘導に至るシグナル伝達を誘導し、I 型インターフェロンの産生を強く亢進する。したがって、ウイルスに感染した宿主細胞において細胞特異的（局所的）に I 型インターフェロンの産生を強く亢進することができる。すなわち、ウイルスに対する免疫応答を亢進できる。

15       (b) ウイルスに感染していない宿主細胞内で、アダプタータンパク質 T I C A M-1 が単独で発現して、下流の I 型インターフェロンの産生誘導に至るシグナル伝達を誘導し、I 型インターフェロンの産生を亢進する。このようなアダプタータンパク質 T I C A M-1 の単独発現でも高い I 型インターフェロン誘導活性がある。ただし、これによる I 型インターフェロンの産生量は(a)によるものと比較すると少ない。

20       これらの結果として、アダプタータンパク質 T I C A M-1 は、以下のような有用性を持つ。

① アダプタータンパク質 T I C A M-1 あるいはアダプタータンパク質 T I C A M-1 を有効成分として含む混合物は、ウイルス感染症の予防・治療剤として極めて有用である。すなわち、主として(a)の作用機序



による I 型インターフェロンの産生亢進の結果として、ウイルス感染時に、前述した I 型インターフェロンによる抗ウイルス効果を、ウイルスに感染した宿主細胞において細胞特異的（局所的）に亢進できる。すなわち、ウイルス感染に対する I 型インターフェロンによる生体防御機能を強化できる。したがって、I 型インターフェロンの過剰な産生による自己免疫疾患等の副作用を最小限に抑制しながらウイルス感染症を予防または治療できる。適用されるウイルス感染症としては、現時点で I 型インターフェロンの有効性が確認されている疾患、すなわち、ウイルス性の B 型肝炎および C 型肝炎（特に遺伝子型が II a のものに有効）等が挙げられる。また、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）によって引き起こされる後天性免疫不全症候群（A I D S；免疫不応答感染症）にも適用できると考えられる。また、アダプタータンパク質 T I C A M-1 は、ウイルスの潜伏感染が予想される部位にアダプタータンパク質 T I C A M-1 を発現させることにより、ウイルス感染の予防が可能である。また、アダプタータンパク質 T I C A M-1 は、単独発現（(b)の作用機序）でも高い I 型インターフェロン誘導活性があるので、T L R 3 が発現しない場合（(a)の作用機序が有効でない場合）にも十分な抗ウイルス作用を奏する。

②アダプタータンパク質 T I C A M-1 あるいはアダプタータンパク質 T I C A M-1 を有効成分として含む混合物は、腫瘍の治療剤としても有用である。すなわち、上記(b)の作用機序による I 型インターフェロンの産生亢進の結果として、前述した I 型インターフェロンによる抗腫瘍効果を亢進できるので、自然免疫療法による腫瘍（癌）の治療が可能となる。適用される腫瘍としては、現時点で I 型インターフェロンの有

効性が確認されている悪性腫瘍（肝がん、腎臓がん、若年性咽頭乳頭腫、悪性リンパ腫、脳腫瘍、膠芽腫、髄芽腫、星細胞腫、皮膚悪性黒色腫等）が挙げられる。

5       なお、本発明に係る治療剤の標的となる細胞としては、ウイルスの二本鎖RNAを認識するTLR3をその表面上で発現するものであることが望ましいが、本発明に係るタンパク質は単独でI型インターフェロンの産生を誘導することができるので、TLR3をその表面上で発現しない細胞にも適用可能である。ただし、ウイルス感染症に適用する場合には、ウイルスの二本鎖RNAを認識するTLR3をその表面上で発現する細胞に導入する方が好ましい。これにより、ウイルス感染部位において局所的にI型インターフェロンの産生を誘導することができ、I型インターフェロンの産生量の増大による副作用を最小限に抑えながら、I型インターフェロンの産生量の増大によるウイルス感染症の治療を効果的に行うことができる。

15       本願発明者等の研究によれば、ヒトTLR3は、様々な樹状細胞（DC）サブセットの中で発現される。また、ヒトTLR3は、ヒト腸上皮細胞やヒト線維芽細胞の中で発現されることが報告されている（M.Muzio, D.Bosisio, N.Polentarutti, G.D'amico, A.Stoppacciro, R.Mancinelli C.van't Veer, G.Penton-Rol, L.P.Ruco, P.Allavena, A.Mantovani, J.Immunol. 164 (2000) 5998-6004およびE.Cario, D.K.Podolsky, Infect.Immun. 68 (2000) 7010-7017）。このことは、その機能が、自然免疫系における微生物核酸成分に対する応答と密接に関連していることを示唆している。したがって、本発明に係るウイルス感染症の治療剤は、ヒトTLR3を発現してタイプIインターフェロンを産生する細胞

、特に、ヒト TLR 3 をその表面上で発現すると共に、RNA ウイルスを認識したときに I 型インターフェロンを産生する細胞に対して効果的である。このような細胞としては、例えば、ヒト肺線維芽細胞やヒト包皮線維芽細胞等のヒト線維芽細胞、ヒト樹状細胞、ヒト腸上皮細胞等が  
5 挙げられる。特に、線維芽細胞は、RNA ウイルス感染または二本鎖 RNA による処理の際に、異なる複数のシグナル伝達経路を経て I 型インターフェロンを産生することが知られており、大きな効果が期待できる。また、マウス TLR 3 を発現して I 型インターフェロンを産生する細胞としては、例えば、マウス線維芽細胞等の細胞が挙げられる。

10 また、アダプタータンパク質 TICAM-1 を含む予防・治療剤の投与方法としては、静脈注射、皮下注射などが好ましいが、舌下錠や直腸投与などの非経口投与でもよい。また、投与形態として、通常の蛋白質の製剤化法により製剤化されたものを使用できる。また、リポソーム製剤などの乳化剤として使用することもできる。

15 アダプタータンパク質 TICAM-1 は、上述した有用性に加えて、以下のような有用性を持つと考えられる。

すなわち、上記(b)の作用機序による I 型インターフェロンの産生亢進の結果として、前述した I 型インターフェロンによる免疫調節効果を亢進できるので、ある種の自己免疫疾患の治療が可能になると考えられる

20 。

また、アダプタータンパク質 TICAM-1 は、TLR 3 とアダプタータンパク質 TICAM-1 との結合、あるいはアダプタータンパク質 TICAM-1 から下流の I 型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を亢進する化合物や、このシグナル伝達を阻害する化合物（阻害剤

）のスクリーニング等にも利用できると考えられる。

また、後述の実施例において詳述するように、上記アダプタータンパク質 T I C A M - 1 は、T L R 3 と結合し、I 型インターフェロンの産生を誘導する分子であり、上記 T L R 3 を介したシグナル伝達系において極めて重要な役割を果たす分子と考えられる。それゆえ、本発明に係る遺伝子およびタンパク質は、上記 T L R 3 を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析にも有効利用できる可能性がある。

#### （４）アダプタータンパク質 T I C A M - 1 の変異体

タンパク質の変異体が、野生型と同様の活性・機能を有する例は既に多数知られている。そのため、アダプタータンパク質 T I C A M - 1 と同様に T L R 3 と特異的に結合する性質および I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を併せ持つアダプタータンパク質 T I C A M - 1 の変異体を作製する方法についても、特に限定されるものではなく、例えば、部位特異的突然変異誘発法（Hashimoto-Gotoh, Gene 152, 271-275 (1995) 他）、P C R 法等を利用して塩基配列に点変異を導入し変異体を作製する方法、あるいはトランスポゾンの挿入による突然変異株作製法などの周知の変異タンパク質作製法を用いて作製することができる。また、変異体の作製には、市販の突然変異誘発キット（例えば、ストラタジーン社製の位置指定突然変異誘発キット "QuickChange"）を利用してもよい。この場合、位置を、T L R 3 と特異的に結合する性質および I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を持つ領域と考えられる T I

Rドメイン以外に変異を導入すれば、TLR3と特異的に結合する性質およびI型インターフェロンの産生を誘導する性質を併せ持つアダプタータンパク質TICAM-1の変異体を確実に作製することができると考えられる。

- 5       すなわち、後段の実施例で述べるように、ヒトTICAM-1を構成するアミノ酸配列のうちほぼToll/インターロイキン1受容体に対して相同性を持つ領域（TIRドメイン）のみからなる、387～556番目のアミノ酸配列からなる変異タンパク質が、ヒトTLR3と特異的に結合する性質およびI型インターフェロンの産生を誘導する性質を併せ持っていたことから、TIRドメイン（ヒトTICAM-1を構成するアミノ酸配列のうちの394～532番目のアミノ酸配列あるいはマウスTICAM-1を構成するアミノ酸配列のうちの396～534番目のアミノ酸配列）を少なくとも有する変異体であれば、TLR3と特異的に結合する性質およびI型インターフェロンの産生を誘導する性質を併せ持つと考えられる。
- 10
- 15

- TLR3と特異的に結合する性質およびI型インターフェロンの産生を誘導する性質を併せ持つアダプタータンパク質TICAM-1の変異体は、前述したアダプタータンパク質TICAM-1と同様の有用性、すなわち、①ウイルス感染症としての有用性、②腫瘍の治療剤としての有用性等を持つ。
- 20

一方、アダプタータンパク質TICAM-1において、TLR3と特異的に結合する性質およびI型インターフェロンの産生を誘導する性質に重要な領域と考えられるTIRドメインに変異を生じさせれば、TLR3と特異的に結合する性質、I型インターフェロンの産生を誘導する

性質のいずれか一方に異常を持つ変異タンパク質を作製できると考えられる。

そして、後段の実施例で述べるように、ヒト T I C A M-1 を構成するアミノ酸配列のうちのほぼ T I R ドメイン（387～556 番目のアミノ酸配列）のみからなる変異タンパク質に対してさらに 434 番目（完全長のヒト T I C A M-1 での位置）のアミノ酸（プロリン）をヒスチジンに置換する点変異を導入した変異タンパク質が、T L R 3 に対して特異的に結合する性質を保持する一方、I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を失ったことから、アダプタータンパク質 T I C A M-1 あるいは T I R ドメインを少なくとも有するその変異体に対して、T I R ドメインのうち、少なくとも 434 番目のアミノ酸（プロリン）を含む一部領域に変異を導入すれば、ヒト T L R 3 に対して特異的に結合する性質を持つ一方、I 型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つ変異タンパク質を作製できると考えられる。

このような T L R 3 に対して特異的に結合する性質を持つ一方、I 型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つアダプタータンパク質 T I C A M-1 の変異体は、T L R 3 から下流の I 型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を阻害して、I 型インターフェロンの産生を抑制することができる。その結果、アダプタータンパク質 T I C A M-1 の制御を介した T L R 3 から下流の I 型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達経路に起因した自己免疫疾患やアトピー性疾患等を治療できると考えられる。すなわち、上記変異タンパク質は、以下の有用性を有すると考えられる。

（ア）上記変異タンパク質またはそれを有効成分として含む混合物は

、自己免疫疾患の治療剤として有用である。

（イ）上記変異タンパク質またはそれを有効成分として含む混合物は、アトピー性疾患の治療剤として有用である。

一方、ヒトT I C A M-1あるいはT I Rドメインを少なくとも有するヒトT I C A M-1の変異体に対して、ヒトT L R 3に対して特異的に結合する性質が失われるように、434番目のアミノ酸（プロリン）以外のT I Rドメインの一部に変異を導入すれば、ヒトT L Rに対して特異的に結合する性質を持つ一方、I型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つ変異タンパク質を作製できると考えられる。

このようなT L R 3に対して特異的に結合する性質を持つ一方、I型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つ変異タンパク質は、前述したアダプタータンパク質T I C A M-1と同様に、ウイルス感染症の予防・治療剤としての有用性、腫瘍の治療剤としての有用性等を持つと考えられる。ただし、この場合、ウイルス感染症の予防・治療剤としての有用性は、前述した(a)の作用機序（ウイルス免疫応答）によるI型インターフェロンの産生亢進の結果ではなく前述した(b)の作用機序（アダプタータンパク質T I C A M-1の単独発現）によるI型インターフェロンの産生亢進の結果である。したがって、この変異体は、アダプタータンパク質T I C A M-1と比較すると、自己免疫疾患等の副作用を抑制する効果やウイルス抑制効果は低い。

#### （5）組換え発現ベクター

本発明に係る組換え発現ベクターは、前述したアダプタータンパク質T I C A M-1またはその変異体をコードする遺伝子を含むものである。

この組換え発現ベクターは、種々の細胞に上記遺伝子を導入してその細胞内でアダプタータンパク質 T I C A M - 1 を産生させることにより、種々の細胞内における T L R 3 を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、  
5、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析に有効利用できる可能性がある。

また、公知の哺乳動物の標的細胞（宿主細胞）内に対して、この組換え発現ベクターに含まれる遺伝子を遺伝子導入法により導入し、その細胞内で発現させることで、前述したアダプタータンパク質 T I C A M -  
10 1 またはその変異体を生体内で産生させることができる。それゆえ、上記組換え発現ベクターは、含有する遺伝子がコードするタンパク質と同様の有用性を有する。すなわち、上記組換え発現ベクターは、含①ウイルス感染症の予防・治療剤としての有用性、②腫瘍の治療剤としての有用性、（ア）自己免疫疾患の治療剤としての有用性、（イ）アトピー性  
15 疾患の治療剤としての有用性等を持つ。

なお、この組換え発現ベクターを用いて哺乳動物の標的細胞内に遺伝子を導入する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(1)哺乳動物の疾患部位から標的細胞を採取し、採取した標的細胞に組換え発現ベクターを導入した後、哺乳動物の体内に戻す方法、(2)哺乳動物の局  
20 所の臓器や癌部にカチオン性リポソームと共に組換え発現ベクターを導入する方法、(3)組換え発現ベクターとしてレトロウイルスベクターやアデノウイルス等のウイルスベクターを用い、ウイルスベクターの感染力を利用して標的細胞内に遺伝子を導入する方法、(4)哺乳動物の局所の臓器や癌部に組換え発現ベクターを導入した後、電極で一定の電場を与え



るエレクトロポレーション法等が挙げられる。

腫瘍に対しアダプタータンパク質 T I C A M-1 を全身投与した場合、腫瘍部位以外でも副作用の強い I 型インターフェロンの産生が亢進されるので、副作用を回避しながら十分な抗腫瘍作用を維持するのが難しいことも考えられる。これに対し、上述した遺伝子導入法などの方法でアダプタータンパク質 T I C A M-1 の局所濃度を挙げれば、腫瘍に対してより適応した治療法を実現できる。したがって、上記組換え発現ベクターは、腫瘍の治療剤として非常に有用である。

#### (6) アダプタータンパク質 T I C A M-1 に対する抗体

本発明に係る抗体は、アダプタータンパク質 T I C A M-1 または変異体と特異的に結合する抗体である。

上記抗体は、宿主細胞におけるアダプタータンパク質 T I C A M-1 の発現の検出、アダプタータンパク質 T I C A M-1 の製造・精製等に有用であると考えられる。

さらに、アダプタータンパク質 T I C A M-1 と特異的に結合する抗体、または T L R 3 に対して特異的に結合する性質と I 型インターフェロンの産生を誘導する性質とを併せ持つアダプタータンパク質 T I C A M-1 の変異体と特異的に結合する抗体は、T L R 3 から下流の I 型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を遮断して、I 型インターフェロンの産生を抑制することができると考えられるので、前述した T L R 3 に対して特異的に結合する性質を持つ一方で I 型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つ変異タンパク質と同様に、(ア) 自己免疫疾患の治療剤としての有用性、(イ) アトピー性疾患の治療剤としての有用性を持つと考えられる。また、上記抗体を用いて I 型インタ

ーフェロンの産生を阻害した状態で、目的遺伝子を挿入したウイルスベクターを宿主細胞に感染させれば、ウイルスベクターによる宿主細胞への目的遺伝子の導入効率を高められると考えられる。

また、上記抗体は、診断薬としても使用できる可能性がある。すなわち、上記抗体を用いて診断対象の個体から採取した細胞におけるアダプタータンパク質 T I C A M-1（または同様の機能を持つ変異体）の発現の有無を検出すれば、この結果に基づいて個体がアダプタータンパク質 T I C A M-1 の欠損や変異に起因する免疫不全症にかかっているか否かを診断することができると考えられる。

上記抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。これは、性質が均一で供給しやすい、将来的にヒト型抗体に変えうる、ハイブリドーマとして半永久的に保存ができるなどの理由による。

上記モノクローナル抗体は、次の方法により作製することができる。すなわち、まず、アダプタータンパク質 T I C A M-1、そのフラグメントまたはその他の誘導体、あるいはそれらのアナログ、もしくはそれらを発現する細胞を免疫原として用いてマウス脾臓リンパ球を免疫し、免疫したマウス脾臓リンパ球とマウスのミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを作製する。次いで、このハイブリドーマによりモノクローナル抗体を産生させる。なお、免疫操作は、公知の各種方法、例えば、ハイブリドーマ法（Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256, 495-497 (1975)）、トリオーマ法、ヒト B-細胞ハイブリドーマ法（Kozbor, Immunology Today 4, 72 (1983)）および E B V-ハイブリドーマ法（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, I

nc., 77-96 (1985) ) などにより行うことができる。

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施例の記載に限定されるものではなく、本発明の範囲内で種々の変更が可能である。

#### 5      〔細胞株・細胞培養〕

ヒト肺線維芽細胞株MRC-5は、理化学研究所（茨城県つくば市高野台3-1-1）の"Riken Cell Bank"に寄託されているものから取得した。また、ヒトの上皮細胞株HeLaは、藤田尚志博士（東京都臨床医学研究所）から提供して頂いたものである。また、実施例で使

10 HEK（ヒト胚腎臓）293細胞株は、ヒトTLR3は発現せず、ヒトTICAM-1のmRNAは極めて低いレベルで発現した（図示しない）。

細胞株MRC-5および細胞株HeLaは、それぞれ5重量%（HeLa）または10重量%（MRC-5）の熱不活性化FCS（JRHバイオサイエンス社）と、抗生物質とを添加したMEM（改変イーグル培

15 地）中で培養した。HEK293細胞は、10重量%のFCSおよび抗生物質を添加したDMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）中で培養した。

#### 〔試薬〕

20 ポリ（I:C）は、Amersham Pharmacia Biotech社から購入した。ポリミキシン(polymixin)B、抗原型O111:B4の大腸菌由来のLPS（リポ多糖；ヒトTLR4によって認識されるグラム陰性細菌の細胞壁成分；以下、「LPS」と略記する）、およびマウスIgG1は、Sigma社から購入した。マイコプラズマリポペプチドMALP-2は、M.

Nishiguchi, M.Matsumoto, T.Takao, M.Hoshino, Y.Shimonishi, S.T  
suji, N.A.Begum, O.Takuchi, S.Akira, K.Toyoshima, T.Seya, J.Im  
munol. 166 (2001) 2610-2616に記載の方法で調製した。これらの試薬  
は、L P Sを除いて、細胞刺激の前にポリミキシンB (10  $\mu$ g / ml  
5 ) によって37℃で1時間処理した。

〔ヒトTLRに対するモノクローナル抗体〕

ヒトTLR3に対するモノクローナル抗体 (TLR3. 7) およびヒ  
トTLR2に対するモノクローナル抗体 (TLR2. 45) は、非特許  
文献1に記載されている方法 (Xu, Y, et al., Structural basis for si  
10 gnal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains, Na  
ture 408: 111-115 (2000)も参照) で作製した。ヒトTLR4に対する  
モノクローナル抗体は、三宅健介博士 (東京大学医化学研究所) から提  
供して頂いたものである (作製法については、R.Shimazu, S.Akashi,  
H.Ogata, Y.Nagai, K.Fukudome, K.Miyake, M.Kimoto, J.Exp.Med.  
15 189 (1999) 1777-1782参照)。

〔cDNA発現ベクター〕

ヒトTLR2、ヒトTLR3、MyD88、およびMal / TIRAP  
PのcDNAを、組換え体ヒトGM-CSF (Peprotech社製) と共に  
9日間培養したヒトの単核細胞から得られたcDNAからPCRによっ  
20 て生成し、哺乳動物の発現ベクターpEFBOS中にクローニングする  
ことで、ヒトTLR2発現ベクター、ヒトTLR3、MyD88発現ベ  
クター、およびMal / TIRAP発現ベクターとした。なお、発現ベ  
クターpEFBOSは、大阪大学の長田重一教授から提供して頂いたプ  
ラスミドベクターである。

ヒト TLR 4 発現ベクターおよび MD-2 発現ベクターは、三宅健介博士（東京大学医化学研究所）から提供して頂いたものである（Shimazu, R., et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J. Exp. Med. 189: 1777-1782 (1999)参照）。

N末端にFlagタグ（Flag標識）を付けたヒト TLR 4 発現ベクターおよびN末端にFlagタグを付けたヒト TLR 2 発現ベクターはそれぞれ、ヒト TLR 4 およびヒト TLR 2 をコードする cDNA を、N末端にFlagタグを付けたプラスミドベクター pCMV-Flag（Sigma社製）に組み込むことにより作成した。

ヒト CD14 発現ベクター（pME18S/CD14）は、西村仁博士（筑波大学）から提供して頂いたものである。

TIRドメインを欠失させたヒト TLR 3 の変異体（TLR 3 を構成するアミノ酸配列のうち 1～729 番目のアミノ酸配列からなるタンパク質；以下、「ヒト TLR 3 deICYT」と記す；）をコードする cDNA は、ヒト TLR 3 の cDNA から PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）によって作製し、発現ベクター pEFBOS 中にクローニングしてヒト TLR 3 deICYT 発現ベクターとした。

ヒト MyD88 の顕性不活性（ドミナントネガティブ）な変異体（ヒト由来のアダプタータンパク質 MyD88 を構成するアミノ酸配列のうち 52～296 番目のアミノ酸配列からなるタンパク質；以下、「TIRMyD88」と記す）をコードする cDNA は、骨髓細胞株 P39 の cDNA から PCR によって作製し、発現ベクター pEFBOS 中に組み込んで TIRMyD88 発現ベクターとした。

ヒトTLR3における795番目のアミノ酸（アラニン）をヒスチジンに置換した変異体（A1a795His；以下、「ヒトTLR3 A795H」と記す）をコードする発現ベクター、およびアダプター分子Mal/TIRAPの顕性不活性な変異体（アダプター分子Mal/TIRAPにおける125番目のアミノ酸（プロリン）をヒスチジンに置換した顕性不活性な変異体；Mal Pro125His；以下、「Mal P125H」と記す）をコードするcDNAは、それぞれヒトTLR3およびMal/TIRAPから「Quick-change」位置指定突然変異誘発キット（Stratagene社製）を用いて生成した。そして、ヒトTLR3 A795HをコードするcDNA、およびMal P125HをコードするcDNAをそれぞれプラスミドベクターpEFBOSに組み込むことにより、ヒトTLR3 A795H発現ベクターおよびMal P125H発現ベクターを得た。

〔実施例1；リポーター遺伝子発現アッセイ〕

HEK293細胞のトランスフェクションにより、ヒトTLR3が、二本鎖RNAの類似体であるポリ（I：C）の存在をアダプター分子MyD88またはMal/TIRAPを介してシグナル伝達するかどうか調べた。

まず、リポーター遺伝子発現アッセイによりNF- $\kappa$ Bの活性化の度合いを分析した。

24ウェルのプレート上のHEK（ヒト胚腎臓）293細胞（1ウェル当たり $2 \times 10^5$ 個）を、遺伝子導入用カチオン性脂質「Lipofectamine 2000」試薬（Gibco社製）を用いて、ルシフェラーゼを連結したNF- $\kappa$ Bレポータ遺伝子（Stratagene社製、 $0.1 \mu\text{g}$

）と、（１）空ベクター、（２）T I R M y D 8 8 発現ベクター（ $0.2 \mu\text{g}$ ）、（３）T I R M y D 8 8 発現ベクター（ $0$ 、 $0.05 \mu\text{g}$ 、 $0.2 \mu\text{g}$ 、または $0.6 \mu\text{g}$ ）およびヒトT L R 2 発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）、（４）空ベクター、（５）T I R M y D 8 8 発現ベクター  
5 （ $0.2 \mu\text{g}$ ）、（６）T I R M y D 8 8 発現ベクター（ $0$ 、 $0.05 \mu\text{g}$ 、 $0.2 \mu\text{g}$ 、または $0.6 \mu\text{g}$ ）およびヒトT L R 3 発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）、（７）空ベクター、（８）M a l P 1 2 5 H 発現ベクター（ $0.2 \mu\text{g}$ ）、（９）M a l P 1 2 5 H 発現ベクター（ $0$ 、 $0.2 \mu\text{g}$ 、または $0.6 \mu\text{g}$ ）およびヒトT L R 4 / C D 1 4 / M D -  
10 2 発現ベクター（ $0.3 \mu\text{g}$ ）、（１０）空ベクター、（１１）M a l P 1 2 5 H 発現ベクター（ $0.2 \mu\text{g}$ ）、または（１２）M a l P 1 2 5 H 発現ベクター（ $0$ 、 $0.2 \mu\text{g}$ 、または $0.6 \mu\text{g}$ ）およびヒトT L R 3 発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）とによって、過渡的にトランスフェクトした。空ベクターを添加することによって、トランスフェクトされるDNAの総量（ $0.8 \sim 1.0 \mu\text{g}$ ）を調整した。また、内部コントロールとして、プラスミドベクターp C M V  $\beta$ （Clontech社製； $5 \text{ ng}$ ）を用いた。

なお、「空ベクター」はc D N Aを組み込んでいないプラスミドベクターp E F B O Sである。また、「ヒトT L R 4 / C D 1 4 / M D - 2  
20 発現ベクター」とは、ヒトT L R 4 発現ベクターとヒトC D 1 4 発現ベクターとM D - 2 発現ベクターとの組み合わせを指す。

トランスフェクトの24時間後に、（１）～（３）のトランスフェクト後の細胞を培地のみまたはポリミキシンBで処理したM A L P - 2（ $100 \text{ nM}$ ）で、（４）～（６）および（１０）～（１２）のトランスフェ

クト後の細胞を培地のみまたはポリミキシンBで処理したポリ（I：C）（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）で、（7）～（9）のトランスフェクト後の細胞を培地のみまたはLPS（ $100 \text{ ng}/\text{ml}$ ）で、それぞれ6時間刺激した。続いて、細胞を溶出バッファ（Promega社製）で溶出した。この溶出液について、トランスフェクト後の刺激によるNF- $\kappa$ Bの活性化の度合いを表すルシフェラーゼの活性を、製造業者の使用説明書に従って測定した。また、計3回の実験を行い、それらの代表値を測定値とした。

トランスフェクト後に刺激を与えた細胞のルシフェラーゼ活性の測定値を、図1（a）～図1（d）に灰色または黒色で示し、トランスフェクト後に刺激を与えなかった（培地のみで刺激した）細胞のルシフェラーゼ活性の測定値を、図1（a）～図1（d）に白色で示す。ルシフェラーゼ活性の測定値は、トランスフェクト後に刺激を与えなかった細胞のルシフェラーゼ活性を1とした相対値（相対刺激）で表している。

次に、p-125 lucリポータープラスミドを用いたリポーター遺伝子発現アッセイによりインターフェロン $\beta$ プロモータの活性化の度合いを分析した。

この「p-125 lucレポータープラスミド」は、東京大学大学院医学系研究科の谷口維紹教授から供与して頂いたものである（T.Taniguchi, K.Ogasawara, A.Takaoka, N.Tanaka, Annu.Rev.Immunol. 19（2001）623-655参照）。p-125 lucレポータープラスミドは、レポーター遺伝子発現ベクターとしての「ピッカジーン(Picagene)」ルシフェラーゼレポータープラスミド（東洋インキ株式会社製）に対して、ヒトインターフェロン $\beta$ プロモータをコードする領域（-125～+19）を



挿入したものである。

p-125 lucリポータープラスミドを用いたリポーター遺伝子  
発現アッセイでは、ルシフェラーゼを連結したNF- $\kappa$ Bレポータ遺伝  
子に代えてp-125 lucリポータープラスミド(0.1  $\mu$ g)を用  
5 いる点と、(1)～(3)のベクターに代えて、(1')空ベクター、  
(2')MalP125H発現ベクター(0.2  $\mu$ g)、または(3'  
)MalP125H発現ベクター(0、0.2  $\mu$ g、または0.6  $\mu$ g  
)およびヒトTLR4/CD14/MD-2発現ベクター(0.3  $\mu$ g  
)を用いる点と、(1)～(3)のベクターを用いてトランスフェクト  
10 した細胞を培地のみまたはLPS(100 ng/ml)で刺激する点と  
を除いて、ルシフェラーゼを連結したNF- $\kappa$ Bレポータ遺伝子を用い  
たりポーター遺伝子発現アッセイと同様の操作を行った。

そして、トランスフェクト後の刺激によるインターフェロン $\beta$ プロモ  
ータの活性化の度合いを表すルシフェラーゼの活性を測定した。得られ  
15 た測定値を、図2(a)～図2(d)に図1(a)～図1(d)と同様  
の形態で示す。

本実施例では、以下の結果が得られた。

まず、アダプター分子MyD88の顕性不活性な変異体TIRMyD  
88の発現は、その量に応じてヒトTLR2を介したヒトTLR2のリ  
20 ガンドMALP-2によるNF- $\kappa$ Bの活性化を著しく阻害した(図1  
(a))。これに対して、アダプター分子MyD88の顕性不活性な変  
異体TIRMyD88の発現は、ヒトTLR3を介したポリ(I:C)  
によるNF- $\kappa$ Bおよびインターフェロン $\beta$ プロモーターの活性化には  
ほとんど影響を与えなかった(図1(b)および図2(b))。

アダプター分子M a l / T I R A P の顕性不活性な変異体M a l P 1 2 5 Hを用いた類似の実験において、アダプター分子M a l / T I R A P がヒトT L R 3 を介するシグナル伝達に寄与しないことも示された（図1（d）および図2（d））。

5      それとは対照的に、ヒトT L R 4 を介するL P S によるN F -  $\kappa$  B およびインターフェロン $\beta$  プロモーターの活性化は、アダプター分子M a l / T I R A P の顕性不活性な変異体M a l P 1 2 5 Hによってその量に応じて阻害された（図1（c）、図2（c））。

10      以上の結果から、ヒトT L R 3 によって媒介されたインターフェロン $\beta$  の産生を誘導するシグナル伝達は、既知のアダプター分子M y D 8 8 およびM a l / T I R A P に依存しないことが分かった。

〔実施例2；リポーター遺伝子発現アッセイ〕

24ウェルのプレート上のH E K（ヒト胚腎臓）293細胞（1ウェル当たり $2 \times 10^5$ 個）を、遺伝子導入用カチオン性脂質「リポフェクトアミン(Lipofectamine) 2000」試薬（Gibco社製）を用いて、ルシフェラーゼを連結したN F -  $\kappa$  B レポーター遺伝子（Stratagene社製、 $0.1 \mu\text{g}$ ）またはp - 1 2 5 1 u c リポータープラスミド（ $0.1 \mu\text{g}$ ）と、空ベクター、ヒトT L R 3 発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）、ヒトT L R 3 d e l C Y T 発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）、またはヒトT L R 3 A 7 9 5 H 発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）とによって、過渡的にトランスフェクトした。

トランスフェクトの24時間後に、（1）～（3）のトランスフェクト後の細胞を培地のみまたはポリミキシンBで処理したポリ（I：C）で6時間刺激した。続いて、細胞を溶出バッファ（Promega社製）で溶出

した。この溶出液について、ルシフェラーゼの活性を測定した。また、計 3 回の実験を行い、それらの代表値を測定値とした。

トランスフェクト後に刺激を与えた細胞のルシフェラーゼ活性の測定値を、図 3 (a)、図 3 (b) に黒色で示し、トランスフェクト後に刺激を与えなかった (培地のみで刺激した) 細胞のルシフェラーゼ活性の測定値を、図 3 (a)、図 3 (b) に白色で示す。ルシフェラーゼ活性の測定値は、トランスフェクト後に刺激を与えなかった細胞のルシフェラーゼ活性を 1 とした相対値 (相対刺激) で表している。

本実施例では、以下の結果が得られた。

ヒト TLR 3 から TIR ドメインを削除したタンパク質であるヒト TLR 3 d e l C Y T をコードする c D N A をトランスフェクトした細胞は、同様に、ポリ (I : C) に応答しなかった (図 3 (a)、図 3 (b))。

ヒト TLR 3 の突然変異体ヒト TLR 3 A 7 9 5 H をコードする c D N A をトランスフェクトした細胞は、TLR 3 d e l C Y T と同様に、ポリ (I : C) に対する応答性を失った。この結果は、ヒト TLR 3 における 7 9 5 番目のアミノ酸 (アラニン) の点突然変異が、NF- $\kappa$ B への下流のシグナル伝達にとっても、インターフェロンプロモーター  $\beta$  の活性化にとっても、極めて重大であることを示唆している。

これに対して、TIR ドメインを含むヒト TLR 3 を発現している細胞は、ポリ (I : C) による刺激の下でインターフェロン  $\beta$  プロモーターを活性化した (図 3 (b))。

〔実施例 3 ; 新規アダプター分子のスクリーニングおよび同定〕

まず、酵母ツー・ハイブリッド・システムから、ヒト TLR 3 の末端

は、あるタンパク質と特異的に会合することが確認された（図４）。

次に、ヒトTLR3のシグナル伝達に関与するアダプター分子を同定するために、酵母ツー・ハイブリッド・システムを用いてスクリーニングを行った。

5       すなわち、ヒトTLR3のTIRドメインに対して特異的に結合する新規アダプター分子のスクリーニングは、酵母ツー・ハイブリッド・システム「マッチメーカー(MATCHMAKER)ツー・ハイブリッド・システム3」（CLONTECH社製）を用いて、cDNAライブラリーの中からヒトTLR3のTIRドメインと相互作用するタンパク質を探索する方  
10       法で行った。

すなわち、まず、転写因子GAL4のDNA結合ドメインの融合ベクターであるプラスミドベクターpGBKT7（CLONTECH社製）のマルチクローニング・サイトに対し、ヒトTLR3のTIRドメイン（ヒトTLR3を構成するアミノ酸配列のうち745～904番目のアミノ  
15       酸配列）およびヒトTLR4のTIRドメイン（ヒトTLR3を構成するアミノ酸配列のうち625～799番目のアミノ酸配列）をコードするcDNAをそれぞれ挿入することにより、いわゆる餌(bait)プラスミドベクターとして、プラスミドベクターpGBKT7-TLR3およびプラスミドベクターpGBKT7-TLR4を作製した。また、転写因  
20       子GAL4の活性化ドメインの融合ベクターであるプラスミドベクターpGADT7（CLONTECH社製）に対し、ヒトの肺由来の「マッチメーカー」cDNAライブラリー（CLONTECH社製）を組み込んで、いわゆる獲物プラスミドベクター群を作製した。

そして、酵母培地において、酵母細胞株AH109（CLONTECH社

製) を、餌プラスミドベクター p G B K T 7 - T L R 3 と、「マッチメーカー」 c D N A ライブラリーより作製した獲物プラスミドベクター群とで形質転換した。酵母培地としては、Sherman, F., Fink, G. R., & Hicks, J. B. Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harhor, NY : Cold Spring Harhor press. (1986) に記載されたものを用いた。

酵母ツー・ハイブリッド・システムでは、獲物プラスミドベクターと餌プラスミドベクターとが相互作用する場合にのみ、酵母細胞がプレート上で増殖できる。この場合、スクリーニング対象の 1,000,000 の形質転換体から、5 つのクローンが S D - T r p - L e u - H i s - A d e プレート (トリプトファン、ロイシン、ヒスチジン、およびアデニンのない S D (Synthetic Dropout) 培地プレート) 上で成長した。

これらのクローンからプラスミドを回収し、プラスミド内の挿入部位の配列を解析した。

B L A S T 検索解析により、クローン 2 . 3 A 1 - 1 が N C B I の E S T (Expressed Sequence Tag) 配列から推定されたヒトの仮定的な m R N A 配列 C L 2 4 7 5 1 を含むことが明らかとなった。挿入部位の 5' 領域内の 12 塩基対が、仮定の m R N A 「L O C 1 4 8 0 2 2」の 3' 末端と重なった。

C L 2 4 7 5 1 は、ヒトのゲノムにおいて L O C 1 4 8 0 2 2 からたった 75 b p しか離れていなかったという事、および L O C 1 4 8 0 2 2 の 3' 末端がポリアデニル酸末端を持たないという事は、これら 2 つの注釈付きの m R N A が 1 つの転写から得られたことを示唆している。

これを確認するために、L O C 1 4 8 0 2 2 中に位置している 5' プライマーおよび C L 2 4 7 5 1 中の 3' プライマーを用いて R T - P C

Rを行った。種々の細胞および組織のmRNAから、予想されたDNA断片を増幅することに成功した。これにより、本願発明者等は、LOC 148022およびCL24751がそれぞれ、新規アダプタータンパク質をコードするcDNAの5'断片および3'断片であると結論した。  
5。PCRによって得られた2つのcDNA断片を連結することによって、完全長のcDNAが得られた。

本願発明者等は、このタンパク質を「TICAM-1 (TIR含有アダプター分子-1)」と命名した。

また、本願発明者等は、以下の方法でヒトTICAM-1に対して相  
10同性を持つマウス由来のタンパク質TICAM-1 (マウスTICAM-1)を見いだした。

まず、ESTに登録されているマウスのcDNAの塩基配列からヒトTICAM-1に相同性を有する配列を探索したところ、ヒトTICAM-1に相同性を有するマウスLOC224899が見つかり、この塩  
15基配列がヒトTICAM-1のマウス相同体をコードするcDNAの塩基配列であるものと推定された。

そこで、ヒトTICAM-1のマウス相同体をコードするものと推定されたマウスLOC224899のアミノ酸配列について、BLASTプログラムにより、ヒトTICAM-1のアミノ酸配列との相同性検索  
20解析を行った。解析結果を図5に示す。なお、ヒトTICAM-1タンパク質およびマウスTICAM-1タンパク質のアミノ酸配列は、cDNAの塩基配列から推定した。また、これらタンパク質のアミノ酸配列は、ClustalWを用いてアラインメントした。

図5において、ヒトTICAM-1のアミノ酸配列を「TICAM-

1. hu」、マウス LOC 224899 のアミノ酸配列を「TICAM-1. mu」と表している。図5において、アスタリスク (\*) は同一の残基を示し、2点 (:) は保存された置換を示し、1点 (·) は準保存された置換を示す。

5 図5の結果から、ESTから推定したマウス LOC 224899 のアミノ酸配列が、ヒト TICAM-1 のアミノ酸配列と非常に類似しており、それゆえ、マウス LOC 224899 が、ヒト TICAM-1 のマウス相同体である可能性が高いことが明らかとなった。このことから、マウス LOC 224899 を、ヒト TICAM-1 のマウス相同体「マウス TICAM-1」と同定した。

10 また、ヒト TICAM-1 およびマウス TICAM-1 は、図5中に上線で示す TIR に類似したモチーフ (TIR ドメイン) を持っており、その領域はヒト TICAM-1 では 394 ~ 532 番目のアミノ酸配列であり、マウス TICAM-1 では 396 ~ 534 番目のアミノ酸配列であった。

15 このマウス TICAM-1 は、ヒト TICAM-1 の TIR ドメイン中の N 末端領域および C 末端領域にあるプロリン・リッチな領域が部分的に欠失していた (図5参照)。マウス TICAM-1 は、ヒト TICAM-1 に対して 54 % の同一性を持っていた。

20 なお、ヒト TICAM-1 およびマウス TICAM-1 の cDNA 配列およびアミノ酸配列は、DDBJ データベースに登録済 (本願出願時には未公表) であり、それらの Genbank アクセッション番号はそれぞれ AB086380 および AB091053 である。

[実施例 4 ; 酵母ツー・ハイブリッド・システムによる相互作用の解

析]

酵母ツー・ハイブリッド・システムにより、ヒトTLR3とヒトTICAM-1との間の相互作用を解析した。

すなわち、まず、プラスミドベクターpGADT7 (CLONTECH社製) に対し、TICAM-1遺伝子の部分的な断片を含むと推定されたcDNAをプラスミドベクターpGADT7のマルチクローニングサイトに組み込んで、いわゆる獲物ベクターとしてのプラスミドベクターpGADT7-TICAM-1を作製した。また、獲物ベクターとしては、このプラスミドベクターpGADT7-TICAM-1と、コントロールとしてのプラスミドベクターpGADT7とを用いた。

一方、餌ベクターとしては、前述したプラスミドベクターpGBKT7-TLR3およびpGBKT7-TLR4と、コントロールとしてのプラスミドベクターpGBKT7 (CLONTECH社製) とを用いた。

そして、実施例4で用いたのと同じ酵母培地において、酵母細胞株AH109 (CLONTECH社製) を、2種類の獲物プラスミドベクターのいずれか (プラスミドベクターpGADT7またはpGADT7-TICAM-1) と、3種類の餌プラスミドベクターのいずれか (プラスミドベクターpGBKT7、pGBKT7-TLR3、またはpGBKT7-TLR4) とで形質転換し、SD-His-Trp-Leu-Adプレート上で画線培養した。結果を図4に示す。

この場合、上記の全ての組み合わせのうち、獲物プラスミドベクターpGADT7-TICAM-1と餌プラスミドベクターpGBKT7-TLR3との組合せだけが、細胞を増殖することができた。また、酵母ツー・ハイブリッド・システムにおいて、ヒトTLR3に代えてヒトT



TLR 2を用いた場合にも、酵母中でTICAM-1がクローニングされなかった（図示しない）。

これにより、酵母ツー・ハイブリッド・システムによるスクリーニングによって同定されたpGADT7-TICAM-1が、ヒトTLR 3のTIRドメインに対して特異的に結合するアダプタータンパク質TICAM-1（ヒトTICAM-1）をコードする遺伝子の部分的な断片を含んでいることが確認された。

〔実施例5；TIRドメインの比較〕

ヒトおよびマウスのTICAM-1、Mal（TIRAP）、およびMyD88のTIRドメインのアラインメントを行い、これらを比較した。

ヒトTICAM-1のTIRドメイン（394～532番目のアミノ酸配列）、マウスTICAM-1のTIRドメイン（396～534番目のアミノ酸配列）、ヒトMyD88（アクセッション番号U70451）のTIRドメイン（160～296番目のアミノ酸配列）、およびヒトMal/TIRAP（アクセッション番号AF406652）のTIRドメイン（85～216番目のアミノ酸配列）を、Clustal Wを用いてアラインメントした。TIRドメインの位置は、SMARTプログラムを用いて推定した。アラインメントした結果を図6に示す。

図6中においても、「TICAM-1. hu」および「TICAM-1. mu」はそれぞれ、「ヒトTICAM-1」および「マウスTICAM-1」を表す。また、アステリスク（\*）は同一の残基を示し、2点（:）は保存された置換を示し、1点（.）は準保存された置換を示す。Box 1～3の詳細については、前述した文献を参照。

## 〔実施例 6 ; T I C A M - 1 の検出〕

ヒトの多数の組織中における T I C A M - 1 の m R N A の発現を、ノーザンブロットキット (CLONTECH社製) を用いたノーザンブロット法で解析した。すなわち、ヒトの 1 2 レーンの「H u m a n M T N B l o t」メンブレンおよび「B l o t I t」メンブレン (CLONTECH社製) を用いて、ヒトの多数の組織から抽出した m R N A を変性条件下で電気泳動した。電気泳動のパターンをフィルターにトランスファーし、C 末端 T I C A M - 1 プローブ (ヒト T I C A M - 1 をコードする c D N A の 1 4 0 6 ~ 2 1 9 3 番目の塩基配列を  $^{32}\text{P}$  で標識したもの) を用いて厳しい条件でハイブリダイズした。「B A S 2 0 0 0」画像解析装置 (富士フイルム株式会社製) を用いて 1 日間露出を行うことによりフィルター上のパターンを撮像した。結果を図 7 の上段に示す。

コントロールとして標識した  $\beta$ -アクトチンプローブを用いて同様の操作を行い、4 時間露出でフィルター上のパターンを撮像した。結果を図 7 の下段に示す。

図 7 に示すように、末梢血白血球 (P B L)、脳(brain)、脾臓(spleen)、胸腺(thymus)、肝臓(liver)、肺(lung)、腎臓(kidney)、骨格筋(skeletal muscle)、心臓(heart)、および胎盤(placenta)を含むたいの組織において、2.6 キロベース (k b) のヒト T I C A M - 1 の m R N A が検出された。

## 〔実施例 7 ; R T - P C R による T I C A M - 1 の検出〕

図 8 に示す複数種のヒト細胞およびヒト細胞株からトータルの R N A を単離し、ヒト T I C A M - 1 のプライマーを用いて R T - P C R を行った。P C R サイクルは 3 5 サイクル実行した。

図 8 において、M f および i D C はそれぞれ、マクロファージおよび未熟樹状細胞を表す。「-」は、鋳型なしのコントロールを示す。また、 $\beta$ -アクチンプライマーをコントロールとして用いて P C R サイクルを 20 サイクル実行した。

5 ヒト末梢血から用意した、未熟樹状細胞 (i D C)、マクロファージ (M  $\Phi$ )、および N K (ナチュラルキラー) 細胞は全て、ヒト T I C A M-1 の m R N A を発現した (図 8)。また、リンパ系の細胞株 (T 細胞 C C R F-C E M、T 細胞 M o l t-4、B 細胞 N a m a l w a) および線維芽細胞の細胞株 (M R C 5) も、ヒト T I C A M-1 の m R N A が陽性であった (図 8)。

これらの結果を総合すれば、ヒト T I C A M-1 の発現が  $\beta$ -アクチンの発現と比較して遍在しており、かつ、弱いと推論される。

[実施例 8 ; 免疫沈降法による T I C A M-1 と T L R 3 の相互作用解析]

15 ヒト T L R 3 の T I R ドメインと T I C A M-1 との会合は、ヒト T L R 3 (F l a g 標識付) およびヒト T I C A M-1 (H A 標識付) を発現している H E K 2 9 3 細胞の免疫沈降法 (イムノプレシピテーション) によって確認した。

20 まず、6 ウェルのプレートで、H E K 2 9 3 細胞を、L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 試薬 (Gibco 社製) を用い、ヒト T L R 3-F l a g 発現ベクター (F l a g タグ付き T I C A M-1 発現ベクター) 3  $\mu$  g および T I C A M-1-H A 発現ベクター (H A タグ付き T I C A M-1 発現ベクター) 0.5  $\mu$  g で過渡的にトランスフェクトした。このとき、空ベクターを加えることによって、D N A の総量を一定 (4  $\mu$  g

）に保った。

トランスフェクトの24時間後、細胞を、培地のみ（図9のレーン1およびレーン3）、あるいはポリ（I：C） $10\mu\text{g}/\text{ml}$ （図9のレーン2およびレーン4）で15分間刺激し、溶出バッファ（pH7.5；25mMのTris、150mMのNaCl、1重量%のNP40、2mMのPMSE、25mMのインドアセトアミド、および10mMのEDTAを含む）中に溶出させた。

遠心分離後に、細胞溶出液を、免疫沈降プローブ（IP）としてマウスIgG1（図9のレーン1およびレーン2）または抗FlagM2抗体（図9のレーン3およびレーン4；Sigma社製）と共に4℃で2時間かけてインキュベートし、免疫沈降させた。コントロール反応のために、マウスIgG1を用いた。免疫複合体を、プロテインG-セファロースにより沈降させ、沈降物を良く洗浄した。

そして、1重量%のSDS、0.2重量%のNP-40、および5重量%の2-メルカプトエタノールを含むDPBSを加えて煮沸することによって、免疫沈降したタンパク質を抽出した。次に、抽出物を抗Flag抗体または抗HA抗体を用いて免疫ブロットした後、SDS-PAGEを行った。溶出液も、トランスフェクトされたTICAM-1-HAの発現を調べるために免疫ブロットした。

得られた結果（ウエスタンブロット；WB）を図9に示す。なお、表中の、+はそれでトランスフェクションあるいは刺激をしたことを、-はそれでトランスフェクションあるいは刺激をしなかったことを示す。また、中央パネルは細胞溶出液の一部のウエスタンブロット（免疫ブロット）であり、下パネルは細胞溶出液全体のウエスタンブロットである

。

図 9 に示すように、ヒト TLR 3 およびヒト TICAM-1 との両方を含む分子複合体が、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降によって検出された（図 9 のレーン 3 およびレーン 4 ; 上パネルの矢印で指す位置）。

したがって、ヒト TICAM-1 が、ヒト TLR 3 と会合することが確認された。

また、ヒト TLR 3 に対する特定のモノクローナル抗体 TLR 3. 7（非特許文献 1 参照）の存在下においても、類似のヒト TLR 3 とヒト TICAM-1 との会合が確認された（図示しない）。また、ヒト TLR 3 を発現した細胞のポリ（I : C）による刺激は、この分子会合にほとんど影響を与えなかった（図 9）。

細胞溶出液全体のウェスタンブロット（WB）は、TICAM-1-HA（中央パネルの矢印で指している位置）の発現を示した。細胞溶出液全体のウェスタンブロットでは、ヒト TICAM-1 のメジャーバンドの上の高分子量型も検出された（図 9 の上パネル）。これは、リン酸化型を表すと考えられる。

次に、同じ条件の下で、他の TLR および TLR 3 変異体に対して TICAM-1 が結合するかを調べた（図 10）。

まず、HEK 293 細胞は、ヒト TICAM-1-HA（0.05  $\mu$ g）と共に、空ベクター（4  $\mu$ g）あるいはヒト TLR 3-Flag 発現ベクター（3  $\mu$ g）、TLR 3 A795H-Flag 発現ベクター（3  $\mu$ g）、Flag-TLR 2 発現ベクター（2  $\mu$ g）、Flag-TLR 4 発現ベクター（2  $\mu$ g）、あるいは MD-2 発現ベクター（1  $\mu$ g）で過渡的にトランスフェクトした。このとき、空ベクターを加えること

によって、DNAの総量を一定（4  $\mu$ g）に保った。トランスフェクトの24時間後に、細胞を溶出バッファで溶出した。

溶出液をマウスIgG1（図示しない）または抗FlagM2抗体（レーン1～5）で免疫沈降した。そして、1重量%のSDS、0.2重量%のNP-40、および5重量%の2-メルカプトエタノールを含むDPBSを加えて煮沸することによって、免疫沈降したタンパク質を抽出した。次に、抽出物を抗Flag抗体または抗HA抗体を用いて免疫プロットした後、SDS-PAGEを行った。溶出液も、トランスフェクトされたTICAM-1-HAの発現を調べるために免疫プロットした。抗Flag抗体または抗HA抗体を用いて免疫プロットを行った。

得られた結果を図10に示す。なお、表中の、+はそれでトランスフェクションをしたことを、-はそれでトランスフェクションをしなかったことを示す。図10の上パネルは、免疫沈降されたFlagタグ付きTLRタンパク質を示す。図10の中パネルは、（レーン2だけ示す）野生型のTLR3（カッコあるいは矢印）と相互作用するTICAM-1を示す。図10の下パネルは、トランスフェクトされたTICAM-1-HA（矢印）の発現を示す。

図10に示すように、ヒトTLR3は、ヒトTICAM-1と共沈したが、TLR3変異体A795H、TLR2、およびTLR4とは共沈しなかった。すなわち、A795H TLR3変異体は、TICAM-1と結合する能力を失った（図10）。TLR2およびTLR4は、MD-2と共発現した場合でさえ、TICAM-1を共沈できなかった（図10）。これらの結果は、TLR2に対するモノクローナル抗体およびTLR4に対するモノクローナル抗体を用いた場合にも、確認された

(図示しない)。

これらの結果から、ヒトT I C A M-1がヒトT L R 3に対して特異的に結合することが確認された。

また、T L R 2、T L R 3、およびT L R 4に対するモノクローナル抗体を用いた実験における、イースト・ツー・ハイブリッド分析および特異性確認の結果を総合すれば、ヒト細胞中において、ヒトT L R 3のT I Rドメインはアダプタータンパク質T I C A M-1と会合できることができる一方、T L R 2やT L R 4はアダプタータンパク質T I C A M-1と会合できないと結論できる。

〔実施例9；ヒトT I C A M-1およびその変異体の発現ベクター作製〕

図11に示すように、ヒトT I C A M-1と、その3種類の変異体、すなわちヒトT I C A M-1の1～288番目のアミノ酸配列を欠失させた変異体（以下、「ヒトT I C A M-1 (ΔN288)」と表記する）、ヒトT I C A M-1の1～386番目のアミノ酸配列を欠失させた変異体（以下、「ヒトT I C A M-1 (ΔN386)」と表記する）、およびほぼヒトT I C A M-1のT I Rドメインのみからなる変異体（以下、「ヒトT I C A M-1 T I R」と表記する）をそれぞれコードする3種類の発現ベクターを作製した。上記のほぼヒトT I C A M-1のT I Rドメインのみからなる変異体（ヒトT I C A M-1 T I R）は、より詳細には、ヒトT I C A M-1の1～386番目のアミノ酸配列と557～712番目のアミノ酸配列とを欠失させた変異体、すなわちヒトT I C A M-1を構成するアミノ酸配列のうち387～556番目のアミノ酸配列からなる変異タンパク質を作製した。

T I C A M - 1 をコードする完全長の c D N A をプラスミドベクター p E F B O S の X h o I - N o t I サイトに組み込んでヒト T I C A M - 1 発現ベクターとした。 p E F B O S - T I C A M - 1 ( Δ N 2 8 8 ) 、 p E F B O S - T I C A M - 1 ( Δ N 3 8 6 ) 、 および p E F B O S - T I C A M - 1 ( T I R ) は、それぞれ、 K o z a c k 配列および第 1 の A T G の後に続いている T I C A M - 1 の 2 8 9 - 7 1 2 番目のアミノ酸配列、 3 8 7 - 7 1 2 番目のアミノ酸配列、 および 3 8 7 - 5 5 6 番目のアミノ酸配列をコードする配列をプラスミドベクター p E F B O S の X h o I - N o t I サイト中に挿入することによって作製した。 これらプラスミドベクターは、内毒素を含まない「 P l a s m i d M a x i 」キット ( Q i a g e n 社製 ) で調製した。

[実施例 10 ; ヒト T I C A M - 1 の変異による機能解析]

ヒト T I C A M - 1 の機能解析を行うために、ヒト T I C A M - 1 およびその変異体について、 N F - κ B およびインターフェロン β の活性化度を測定するリポーター遺伝子発現アッセイを行った。 すなわち、インターフェロン β プロモーター等に対する T I C A M - 1 の機能的な結合を H E K 2 9 3 細胞中で調べた。

24 ウェルのプレート上の H E K 2 9 3 細胞 ( 1 ウェル当たり 2 × 1 0<sup>5</sup> 個 ) を、遺伝子導入用カチオン性脂質「 L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 」試薬 ( G i b c o 社製 ) を用いて、ルシフェラーゼを連結した N F - κ B レポーター遺伝子 ( S t r a t a g e n e 社製 ) 0.1 μ g ( 図 1 2 ( b ) ) または p 1 2 5 1 u c リポータープラスミド 0.1 μ g ( 図 1 2 ( a ) ) と、空ベクター、ヒト T I C A M - 1 T I R、ヒト T I C A M - 1 ( Δ N 3 8 6 ) 、ヒト T I C A M - 1 ( Δ N 2 8 8 ) 、または完全長の



ヒト T I C A M - 1 を発現するベクター（それぞれ 1 0 n g または 1 0 0 n g）とでトランスフェクトした。空ベクターを添加することによって、トランスフェクトされる DNA の総量（0. 8 ~ 1. 0  $\mu$  g）を調整した。また、内部コントロールとして、プラスミドベクター p C M V  $\beta$ （Clontech 社製；5 n g）を用いた。

トランスフェクトの 2 4 時間後に、細胞を溶出バッファ（Promega 社製）で溶出した。この溶出液について、トランスフェクト後の刺激による N F -  $\kappa$  B の活性化の度合いを表すルシフェラーゼの活性を、製造業者の使用説明書に従って測定した。また、計 3 回の実験を行い、それらの代表値を測定値とした。インターフェロン  $\beta$  の活性化度を図 1 2（a）に、N F -  $\kappa$  B の活性化度を図 1 2（b）にそれぞれ示す。

結果として、インターフェロン  $\beta$  プロモーター活性化の顕著な亢進が、少量（0. 1  $\mu$  g）の完全長ヒト T I C A M - 1 を発現している H E K 2 9 3 細胞において観察された（図 1 2（a））。図 1 2（a）、図 1 2（b）の染色体欠失分析は、ヒト T I C A M - 1 由来の T I R ドメインが、顕性不活性体として作用する M y D 8 8 の T I R とは異なり、上記機能を担っていることを示唆している。T I R ドメインに対する N 末端領域および C 末端領域の連結反応は、インターフェロン  $\beta$  プロモーターの活性化度を高めた（図 1 2（a））。それゆえ、ヒト T I C A M - 1 の T I R ドメインは、ヒト T L R 3 の末端を下流の分子と結合させてインターフェロン  $\beta$  プロモーターを活性化するのに十分な最小の必須成分と考えられる。

また、図 1 2（b）に示すヒト T I C A M - 1 による N F -  $\kappa$  B を活性化する能力を類似のトランスフェクト実験で調べた結果から、完全長

の T I C A M-1 は、インターフェロン  $\beta$  プロモーターと比較して弱く N F- $\kappa$  B プロモーターを活性化することが分かった。N F- $\kappa$  B の活性化能は、T I R ドメインあるいは完全長の T I C A M-1 を持つ細胞よりも、N 末端ドメインのない変異体の方が高かった（図 1 2 (a)、  
5 図 1 2 (b)）。それゆえ、N 末端配列は、トランスフェクタント上でのインターフェロン  $\beta$  産生に対して強い優先性を誘導し、同時に N F- $\kappa$  B の活性化を比較的抑制すると思われる。また、C 末端領域は、インターフェロン  $\beta$  および N F- $\kappa$  B 活性化の両方を少し増強した（図 1 2 (a)、図 1 2 (b)）。

10 さらに、完全長のヒト T I C A M-1 を発現している細胞においては、T L R 3 のトランスフェクトなしにインターフェロン  $\beta$  プロモーターの活性化が誘発されることがあった（図 1 2 (a)、図 1 2 (b)）。

このことから、ヒト T I C A M-1 は、自発的に、インターフェロン  $\beta$  プロモーターを活性化し、インターフェロン  $\beta$  の産生を誘導すると考  
15 えられる。この自発的なインターフェロン  $\beta$  の産生誘導は、ヒト T I C A M-1 が、未知の分子とのホモ二量化あるいは錯体形成を起こすことに起因すると考えられる。この研究結果は、自動二量化する傾向があるアダプター分子 M a 1 に関する研究、および同じく自動二量化する傾向があるアダプター分子 M y D 8 8 の T I R ドメインの構造解析結果と整  
20 合している。

〔実施例 1 1 ; T L R 3 によって媒介されるシグナル伝達の解析〕

次に、ヒト T L R 3 によって媒介されるシグナル伝達を解析するためのリポーター遺伝子発現アッセイを行った。すなわち、T I C A M-1 の最小の必須成分である T I R ドメインを H E K 2 9 3 細胞に用い、イ

インターフェロン $\beta$ プロモーターの活性化に対するTLR3および／またはポリ(I:C)の効果が相加的なものであるかどうかを調べた。

まず、ヒトTICAM-1 TIR発現ベクター(pEFBOS-TICAM-1 (TIR)) に対して、434番目のアミノ酸(プロリン)をヒスチジンに置換する点突然変異を挿入することによって、ヒトTICAM-1 TIRの顕性不活性な変異体を作製した。作製した変異体は、「TIR P434H」と命名した。

24ウェルのプレート上のHEK293細胞(1ウェル当たり $2 \times 10^5$ 個)を、遺伝子導入用カチオン性脂質「Lipofectamine 2000」試薬(Gibco社製)を用いて、ルシフェラーゼを連結したNF- $\kappa$ Bレポーター遺伝子(Stratagene社製)  $0.1 \mu\text{g}$  (図13(b)) またはp125 lucリポータープラスミド  $0.1 \mu\text{g}$  (図13(a)) と、TICAM-1 TIR ( $0.1 \text{ ng}$  および  $10 \text{ ng}$ ) またはTICAM-1 TIRの顕性不活性な変異体TIR P434Hをコードしているプラスミド ( $0$ 、 $0.2 \mu\text{g}$ 、 $0.6 \mu\text{g}$ ) と、空ベクター、TLR2 ( $0.1 \mu\text{g}$ )、またはTLR3 ( $0.1 \mu\text{g}$ ) とでトランスフェクトした。空ベクターを添加することによって、トランスフェクトされるDNAの総量 ( $0.8 \sim 1.0 \mu\text{g}$ ) を調整した。また、内部コントロールとして、プラスミドベクターpCMV $\beta$  (Clontech社製;  $5 \text{ ng}$ ) を用いた。

トランスフェクトの24時間後に、細胞を  $100 \text{ nM}$  のMALP-2 (TLR2刺激) あるいは  $10 \mu\text{g/ml}$  のポリ(I:C) (TLR3刺激) で6時間刺激し、細胞を溶出バッファ(Promega社製)で溶出した。この溶出液について、トランスフェクト後の刺激によるインターフ

ェロン $\beta$ の活性またはNF- $\kappa$ Bの活性を表すルシフェラーゼの活性を、製造業者の使用説明書に従って測定した。また、計3回の実験を行い、それらの代表値を測定値とした。インターフェロン $\beta$ の活性化度を図13(a)に、NF- $\kappa$ Bの活性化度を図13(b)にそれぞれ示す。

5 TLR3およびTICAM-1のTIRの両方をトランスフェクトした結果、インターフェロン $\beta$ プロモーターが強く活性化された(図13(a)、図13(b))。また、低い導入量のTICAM-1 TIRトランスフェクタント(図13(a)、図13(b))の結果から非常に明確に示されているように、ポリ(I:C)によるコトランスフェク  
10 タントの刺激は、TICAM-1を介するインターフェロン $\beta$ プロモーターの活性化を亢進した。ヒトTICAM-1を発現している細胞に対してヒトTLR3コトランスフェクションおよびポリ(I:C)刺激を行ったことによるNF- $\kappa$ B活性化の亢進がみられた(図13(a)、図13(b))。一方、ヒトTLR2を発現する細胞に対してTICA  
15 M-1による追加のトランスフェクションを行っても、ヒトTLR2刺激に応答したNF- $\kappa$ Bの活性化が起こらなかった(図13(a)、図13(b))。これらから、ヒトTICAM-1がヒトTLR3に対して特異性を有していると考えられる。また、HEK293細胞中でTICAM-1のTIRと共にTLR2を発現させたところ、ヒトTLR2  
20 のリガンドであるマイコプラズマリポペプチドMALP-2で刺激された細胞中でさえ、インターフェロン $\beta$ プロモーターの発現を活性化しなかった(図13(a)、図13(b))。

以上のことから、ヒトTICAM-1に対するヒトTLR3の機能的な会合は、ポリ(I:C)によって媒介されるインターフェロン $\beta$ プロ

モーターの活性化に関与すると考えられる。

また、興味深いことに、活性な T I C A M - 1 T I R の代わりに T I C A M - 1 T I R の顕性不活性な変異体 P 4 3 4 H をトランスフェクトした場合、ポリ ( I : C ) - T L R 3 によって媒介されるインターフェロン  $\beta$  プロモーターおよび N F -  $\kappa$  B の活性化が完全にキャンセルされた ( 図 1 3 ( a ) 、 図 1 3 ( b ) ) 。これは、T I C A M - 1 T I R の顕性不活性な変異体 P 4 3 4 H は、ヒト T L R 3 に結合する能力を持つ一方、インターフェロン  $\beta$  の産生を誘導する能力を失っているためと考えられる。したがって、この変異体は、むしろヒト T L R 3 を介するシグナル伝達を遮断してインターフェロン  $\beta$  の産生を阻害するものと考えられる。

〔実施例 1 2 ; アダプター分子の機能解析〕

次に、ヒト T I C A M - 1 と既知のアダプター分子 M y D 8 8 および M a 1 / T I R A P との間でインターフェロン  $\beta$  および N F -  $\kappa$  B の活性化度を比較するためのリポーター遺伝子発現アッセイを行った。

2 4 ウェルのプレート上の H E K 2 9 3 細胞 ( 1 ウェル当たり  $2 \times 10^5$  個 ) を、遺伝子導入用カチオン性脂質「L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0」試薬 ( Gibco 社製 ) を用いて、ルシフェラーゼを連結した N F -  $\kappa$  B レポーター遺伝子 ( Stratagene 社製 )  $0.1 \mu g$  ( 図 1 4 ( b ) ) または p 1 2 5 l u c リポータープラスミド  $0.1 \mu g$  ( 図 1 4 ( a ) ) と、空ベクター、M y D 8 8 、M a 1 / T I R A P 、または完全長の T I C A M - 1 ( それぞれ 1 0 、 1 0 0 、または 2 0 0 n g ) とでトランスフェクトした。空ベクターを添加することによって、トランスフェクトされる DNA の総量 (  $0.8 \sim 1.0 \mu g$  ) を調整した。また、

内部コントロールとして、プラスミドベクター pCMV $\beta$  (Clontech社製; 5 ng) を用いた。

トランスフェクトの24時間後に、細胞を溶出バッファ (Promega社製) で溶出した。この溶出液について、インターフェロン $\beta$ の活性またはNF- $\kappa$ Bの活性を表すルシフェラーゼの活性を、製造業者の使用説明書に従って測定した。また、計3回の実験を行い、それらの代表値を測定値とした。インターフェロン $\beta$ の活性化度を図14(a)に、NF- $\kappa$ Bの活性化度を図14(b)にそれぞれ示す。

インターフェロン $\beta$ プロモーターおよびNF- $\kappa$ Bの活性化プロフィールを比較 (図14(a)、図14(b)) すると、これらの3つのアダプター分子は、NF- $\kappa$ Bに対して類似レベルの活性化を誘導した (図14(a)、図14(b)) のに対し、TLR3および/またはポリ(I:C) のようないかなる刺激もない条件において、完全長のヒトTICAM-1によるインターフェロン $\beta$ プロモーター誘発活性は、アダプター分子Mal/TIRAPまたはMyD88によるインターフェロン $\beta$ プロモーター誘発活性と比較して100倍以上高かった (図14(a)、図14(b))。したがって、ヒトTICAM-1は、インターフェロン $\beta$ プロモーターに対してより直接的に作用し、インターフェロン $\beta$ の産生を顕著に亢進することができると考えられる。

#### [実施例13; ウェスタンブロット]

HEK293細胞を、アダプター分子Mal-HA、MyD88-HA、あるいはTICAM-1-HAをそれぞれコードするプラスミド (100 ng) で過渡的にトランスフェクトした。トランスフェクトから24時間後に、細胞を溶解し、発現されたタンパク質を抗HA抗体を用

いてウエスタンブロット法により解析した。

得られたウエスタンブロットを図 1 5 に示す。左側の黒い矢印は M a  
1 - H A の発現を示し、中央の白抜きの矢印は M y D 8 8 - H A を示し  
、右側の矢印は T I C A M - 1 - H A の発現を示す。図 1 5 の結果から  
5 、これらのアダプター分子は、妥当なタンパク質発現レベルを持つこと  
が確認された。

〔実施例 1 4 ; T I C A M - 1 ノックダウン〕

次に、T I C A M - 1 を介するインターフェロン  $\beta$  の産生誘導へのシ  
グナル伝達を確認するために、一本鎖 R N A のトランスフェクションに  
10 よってヒト T I C A M - 1 ノックダウン細胞を生成した。

ヒト T I C A M - 1 の一本鎖 R N A の配列は、図 1 6 に示すように、  
センスが r [ G A C C A G A C G C C A C U C C A A C ] d [ T T ] で  
あり、アンチセンスが r [ G U U G G A G U G G C G U C U G G U C ]  
d [ T T ] ( T I C A M - 1 ) である。「r」および「d」はそれぞれ  
15 、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを表す。T I C A  
M - 1 のメッセージ中における一本鎖 R N A 領域を、一本鎖 R N A 配列  
の下に示す。

遺伝子をサイレントにするのに有効なヒト T I C A M - 1 メッセージ  
中における一本鎖 R N A のトランスフェクションの位置は、図 1 6 に示  
20 すように、9 8 6 ~ 1 0 0 8 番目の塩基配列 ( b p ) である。

H e L a 細胞および M R C - 5 細胞は、細胞表面上で T L R 3 を発現  
し、外因的に付加的なポリ ( I : C ) に応答してインターフェロン  $\beta$  を  
産生した。これらは両方とも、T I C A M - 1 および T L R 3 の m R N  
A を含んでいた ( データは示していない ) 。一本鎖 R N A を上記の位置

に導入した細胞内ではインターフェロン $\beta$ の産生が部分的に減少していた。

〔実施例 15 ; R T - P C R〕

ヒト T I C A M - 1 のプライマーまたは  $\beta$  - アクチンのプライマーを用いて R T - P C R 分析を行った。結果を図 17 ( a ) 、図 17 ( b ) に示す。図 17 ( a ) は H e L a 細胞であり、図 17 ( b ) は M R C - 5 細胞である。

用いたヒト T I C A M - 1 のプライマーの配列は、5' C C A G A T G C A A C C T C C A C T G G 3' ( 5' プライマー) および 5' T G G A G G A A G G A A C A G G A C A C C 3' ( 3' プライマー) である。

ヒト T I C A M - 1 の m R N A レベルは、H e L a 細胞および M R C - 5 細胞中において R N A i ( R N A 干渉) 法によって約 80 % 抑制された ( 図 17 ( a ) 、図 17 ( b ) ) 。

したがって、これらの実験によって、T I C A M - 1 が、二本鎖 R N A によって媒介された T L R 3 の活性化とインターフェロン $\beta$ の産生とをつなぐアダプター分子であるという直接的な証拠が得られた。

〔実施例 16 ; R N A i〕

R N A i により二本鎖 R N A の補充が、ヒト T I C A M - 1 が減少された H e L a 細胞および M R C - 5 細胞中におけるインターフェロン $\beta$ タンパク質の産生を誘発するかどうかを調べた。

H e L a 細胞または M R C - 5 細胞を、「O l i g o f e c t a m i n e」 (Invitrogen社 ; 最終濃度 200 n M) を用い、バッファだけ、ラミン (Lamin) A / C の一本鎖 R N A (コントロール ; 最終濃度 200 n



M)、またはヒト T I C A M-1 の一本鎖 RNA でトランスフェクトした。トランスフェクトから 48 時間後に、H e L a 細胞および M R C-5 細胞をそれぞれ、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  および  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のポリ (I : C) で刺激した。24 時間の刺激の前 (0 時間刺激後) および 24 時間の刺激の後における上清のインターフェロン  $\beta$  の濃度を E L I S A で測定した。H e L a 細胞の測定結果を図 18 (a) に、M R C-5 細胞の測定結果を図 18 (b) に示す。

R N A i の基本的な方法は、Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411: 494-498 (2001) に記載されている。また、詳細な手順および条件は Oshiumi, H., Brgum, N. A., Matsumoto, M., & Seya, T. RNA interference for mammalian cells, Folia Pharme, Jpn. 120: 91-95 (2002) に記載されている。

ヒト T I C A M-1 の一本鎖 RNA の配列は、センスが r [G A C C A G A C G C C A C U C C A A C] d [T T] であり、アンチセンスが r [G U U G G A G U G G C G U C U G G U C] d [T T] (T I C A M-1) である。また、l a m i n A / C の一本鎖 RNA の配列は、センスが r [C U G G A C U U C C A G A A G A A C A] d [T T]、アンチセンスが r [U G U U C U U C U G G A A G U C C A G] d [T T] である。ここで、「r」および「d」はそれぞれ、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを表す。これらの一本鎖 RNA は、X e r a g o n 社 (U S A) から購入した。

ポリ (I : C) ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  または  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) で刺激した

細胞（H e L a 細胞またはM R C - 5 細胞）を 2 4 時間（2 4 h）培養し、上清を採取した。培養液の上清中におけるヒトインターフェロン  $\beta$  の濃度は、E L I S A（酵素結合免疫吸着定量法；T E B 社製）によって測定した。結果を図 1 8（a）、図 1 8（b）に示す。

- 5       これらの細胞中においては、インターフェロン  $\beta$  産生のレベルは、一本鎖 R N A によって約 5 0 % まで特異的に阻害された（図 1 8（a）、図 1 8（b））。

したがって、これらの実験によって、T I C A M - 1 が、二本鎖 R N A によって媒介された T L R 3 の活性化とインターフェロン  $\beta$  の産生と  
10       をつなぐアダプター分子であるという直接的な証拠が得られた。

#### 産業上の利用の可能性

本発明は、以上のように、哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に対して特異的に結合して I 型インターフェロンの産生を誘導する新規アダプター  
15       タンパク質およびその変異体、上記タンパク質の遺伝子、上記遺伝子を含む組換え発現ベクター、上記タンパク質に対する抗体に関するものであり、前述したとおり、上記 T L R 3 を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析、B 型肝炎や C 型肝炎等のウ  
20       イルス感染症の予防・治療、腫瘍の治療、自己免疫疾患の治療、アトピー性疾患の治療などに利用できるほか種々の有用性を有する。したがって、本発明は、各種医薬品産業等、広く医療の発展に寄与するものと考えられる。

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
2. 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列から  
5 なり、かつ、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のうち 3 9 4 ～ 5 3 2 番目のアミノ酸配列を有するタンパク質。
3. 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列から  
10 なり、かつ、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列のうち 3 9 6 ～ 5 3 4 番目のアミノ酸配列を有するタンパク質。
4. 配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、哺乳動物の T o 1 1 様受容体 3 に対して特異的に結合する性質と、I 型インターフェロンの産生を誘導する性質とを併せ  
15 持つタンパク質。
5. 配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、哺乳動物の I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を持つ一方、哺乳動物の T o 1 1 様受容体 3 に対して特異的に結合する性質に異常を持つタンパク質。  
20
6. 配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、哺乳動物の T o 1 1 様受容体 3 に対して特異的に結合する性質を持つ一方、哺乳動物の I 型インターフェロンの産生を誘

導する性質に異常を持つタンパク質。

7. 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、少なくとも434番目のアミノ酸が置換又は欠失され、かつ、394～532番目のアミノ酸配列の少なくとも一部を保持している請求の範囲6記載のタンパク質。

8. 請求の範囲1ないし7のいずれか1項に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

9. cDNAであって、配列番号1に示される塩基配列のうち、63～2198番目の塩基配列をオープンリーディングフレームとして有する請求の範囲8記載の遺伝子。

10. cDNAであって、配列番号3に示される塩基配列のうち、66～2261番目の塩基配列をオープンリーディングフレームとして有する請求の範囲8記載の遺伝子。

11. 請求の範囲8ないし10のいずれか1項に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

12. 請求の範囲1ないし5のいずれか1項に記載のタンパク質に対して特異的に結合する抗体。

13. 請求の範囲1ないし5のいずれか1項に記載のタンパク質を有効成分として含むウイルス感染症の予防・治療剤。

14. 請求の範囲1ないし5のいずれか1項に記載のタンパク質を有効成分として含む腫瘍の治療剤。

15. 請求の範囲1ないし5のいずれか1項に記載のタンパク質をコードする遺伝子を含む組換え発現ベクターを有効成分として含むウイルス感染症の予防・治療剤。

16. 請求の範囲 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードする遺伝子を含む組換え発現ベクターを有効成分として含む腫瘍の治療剤。

5 17. 請求の範囲 6 または 7 に記載のタンパク質を有効成分として含む自己免疫疾患の治療剤。

18. 請求の範囲 6 または 7 に記載のタンパク質を有効成分として含むアトピー性疾患の治療剤。

19. 請求の範囲 6 または 7 に記載のタンパク質をコードする遺伝子を含む組換え発現ベクターを有効成分として含む自己免疫疾患の治療剤。

10 20. 請求の範囲 6 または 7 に記載のタンパク質をコードする遺伝子を含む組換え発現ベクターを有効成分として含むアトピー性疾患の治療剤。

21. 請求の範囲 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質に対して特異的に結合する抗体を有効成分として含む自己免疫疾患の治療剤。

15 22. 請求の範囲 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質に対して特異的に結合する抗体を有効成分として含むアトピー性疾患の治療剤。

1/16

NF- $\kappa$ B

図 1 (a)

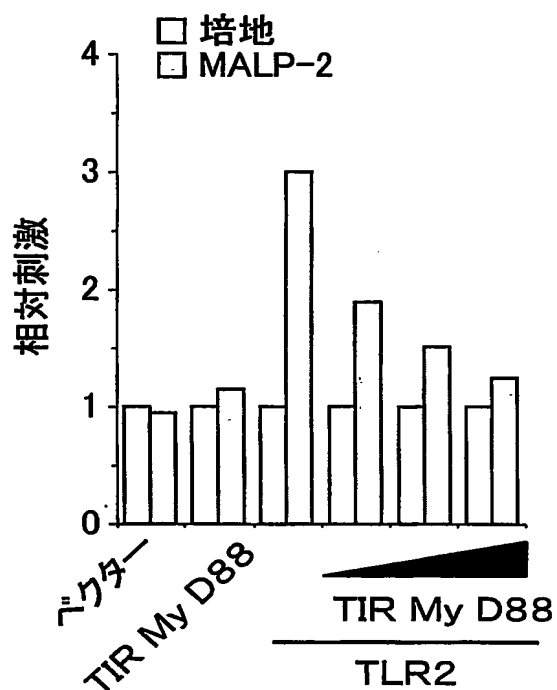


図 1 (b)

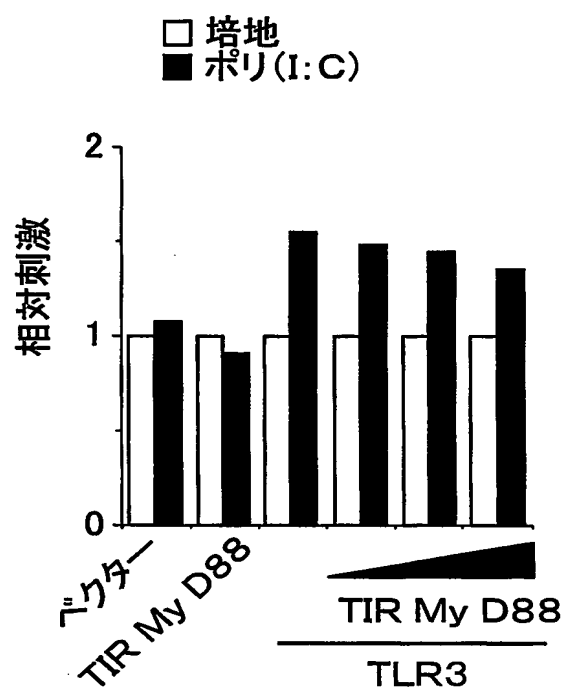


図 1 (c)

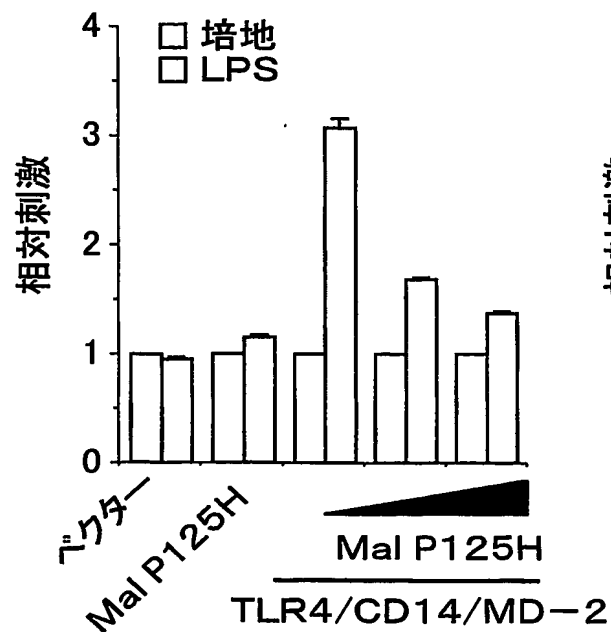
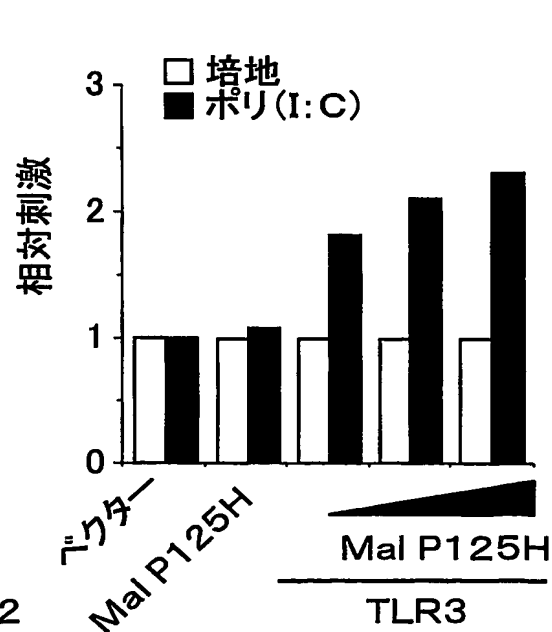


図 1 (d)



2/16

インターフェロン $\beta$ 

図 2 (a)

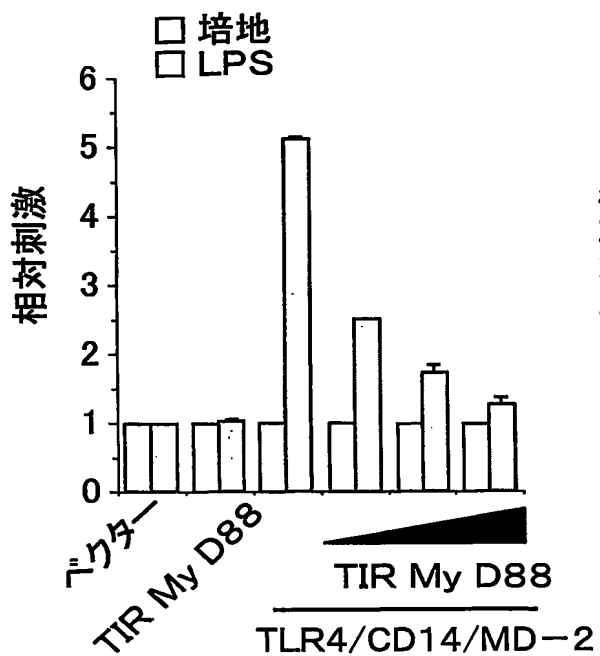


図 2 (b)

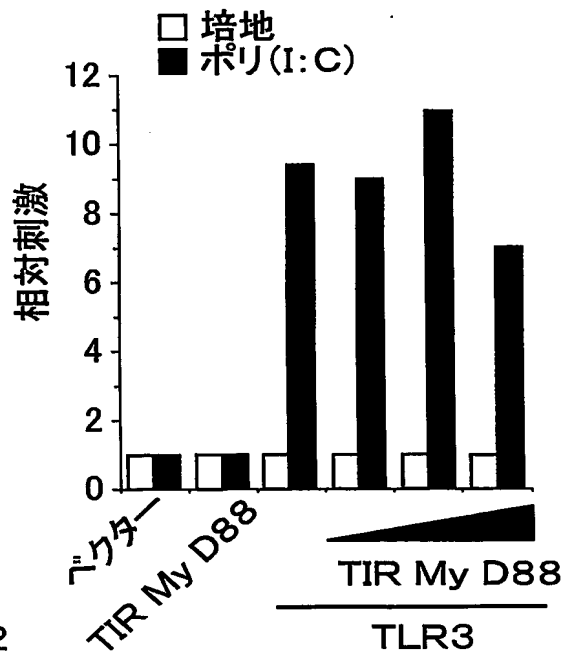


図 2 (c)

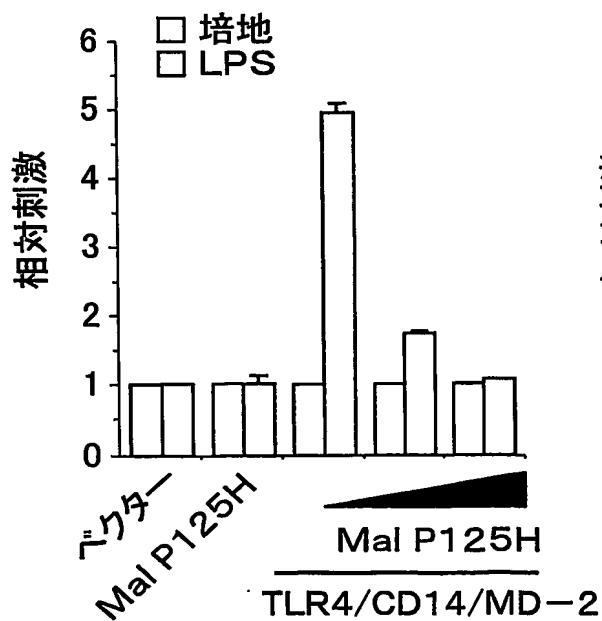
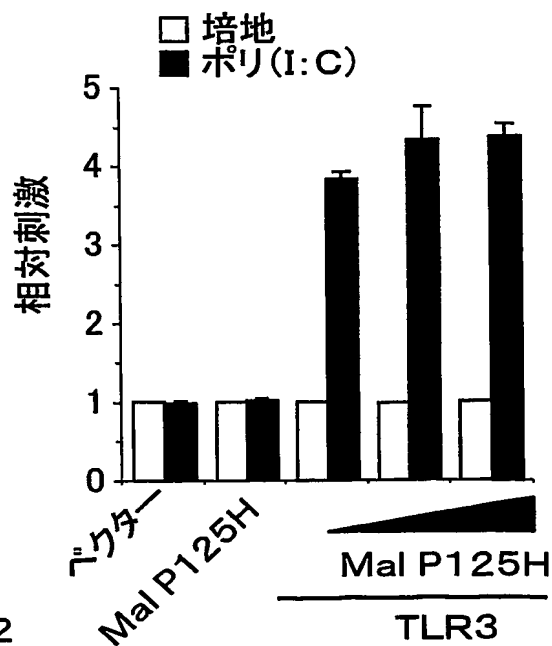


図 2 (d)



3/16

図 3 (a)

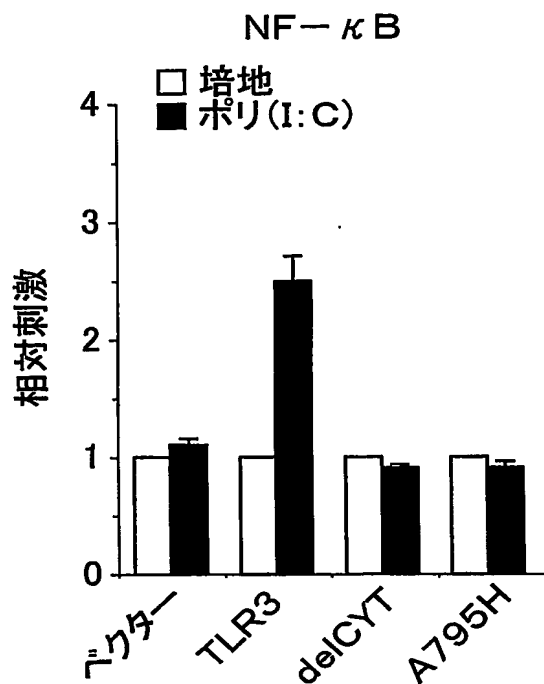


図 3 (b)

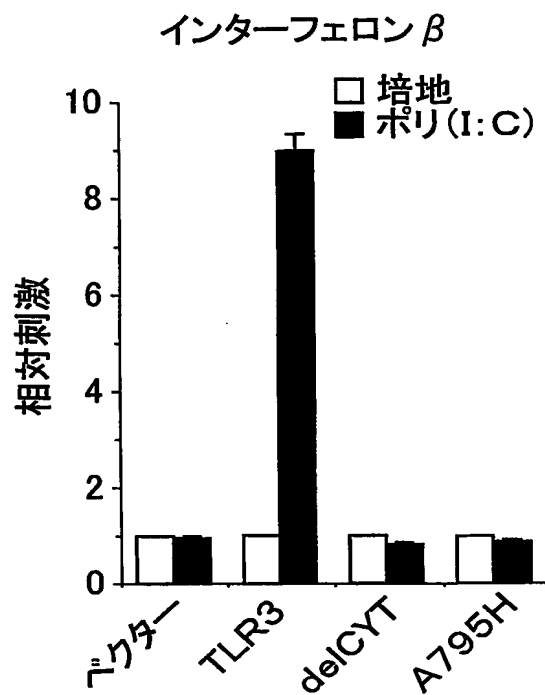
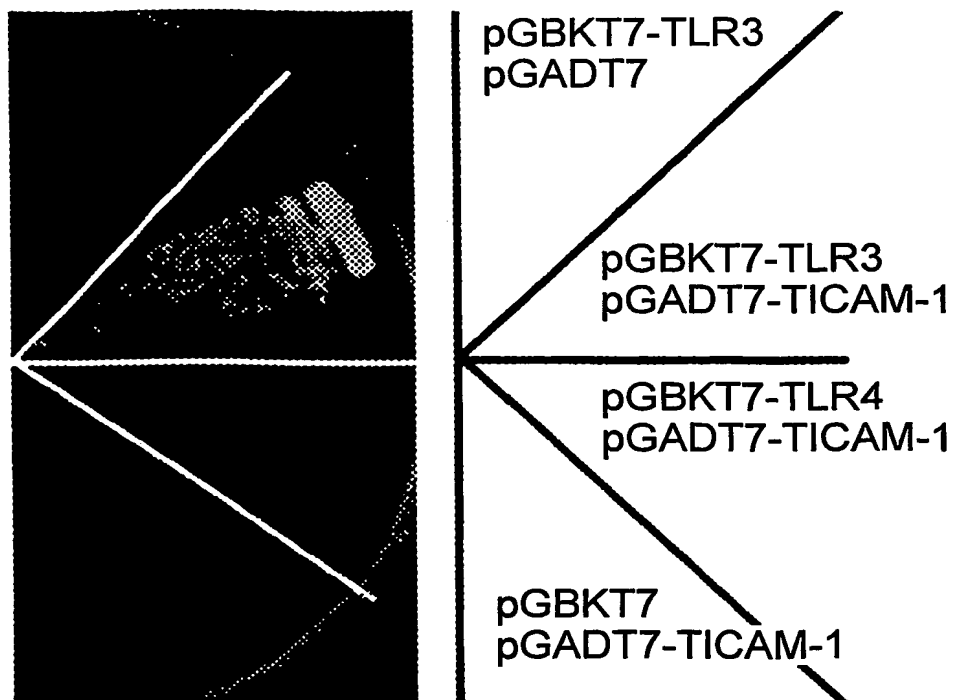


図 4

SD-Trp-Leu-His-Ade plate





4/16

## 図 5

TICAM-1. hu TICAM-1. mu	MACTGPSLPSAFDILGAAGQDKLLYLKHKLKTTPRPGCQGQDLLHAMVLLKLQGETEARIS MDNPGPSLRGAFGILGALERDRLTHLKHKLGSLSGSGSQESKLLHAMVLLALGQDTEARVS * . **** . ** . **** : * : * : * : * : * : * . * . * . * . * . * . * . * . *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	LEALKADAVARLVARQWAGVDSTEDPEEPPDVSWAVARLYHLLAEKLCPASLRDVAYQE LES LKMNTVAQLVAHQWADMETTEGPEEPPDLSWTVARLYHLLAEENLCPASTRDMAYQV * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	AVRTLSSRDDHRLGELQDEARNRCGWDIAGDPGSI RTLQSNL GCLPPSSALPSGTRSLPR ALRDFASQGDHQLGQLQNEAWDRCSSDIKGDPSGFQPLHSHQGS LQPPSASP AVTRSQPR * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	PIDGVSDWSQGCSLRSTGSPASLASNLEISQSPTMPFLSLHRSPHGPSKLCDDPQASLVP PID-TPDWSWGHTLHSTNSTASLASHLEISQSPTLAFLSSHGTHGSPKLCNTPLDTQEP * * * . * * * * : * : * : * . * . * . * . * . * . * . * . * . * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	EPVPGGCQEPEEMSWPPSGEIASPPELPSSPPPGLPEVAPDATSTGLPDTAAPETSTNY QLVPEGCQEPEEISWPPSVETSVSLGLP--HEISVPEVSPEEASPI LPDALAAPDTSVHC : * * * . * . * . * . * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	PVECTEGSAGPQSLPLPILEPVKNPCSVKDQTPQLQSVEDTTSPTNKPCPPTPTTPETSP PIECTELSTNSRSPLTSTTESVGKQWPITSQRSPQVPVGGDSLQNTTSSSPPAQPSSLQA * : * . * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * . * . * . *
	TIR
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	PPPPPP---SSTPCSAHLTPSSLFPSSLESSS-EQKFYNFVILHARADEHIALRVREK SPKLPPSPPLSSASSPSSYPAPPTSTSPVLHSETSDQKFYNFVILHARADEQVALRIREK * * * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	LEALGVPDGFCEDFQVPGRGELSCLQDAIDHSAFIILLTSNFDCRLSLHQVNQAMMS LETLGVPDGFCEEFQVPGRGELHCLQDAIDHSGFTILLTASFDCSLSLHQINHALMN * : * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	NLTRQGSPPDCVIFPLPLESSPAQLSSDTASLLSGLVRLDEHSQIFARKVANTFKPHRLQA SLTQSGRQDCVIFLLPLECSQAQLSPDTRLLHSIVWLDEHSPIFARKVANTFKTQKLQA * : * : * * . * . * . * . * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	RKAMWRKEQDTRALREQSQHLDGERMQAAALNAAYSAYLQSYLSYQAQMEQLQVAFGSHM QVRWKKAEARTLKEQSIQLEAERQNVAASAAAYTAYVHSYRAWQAEMNKLGVAFGKNL : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	SFGTGAPYGARMPFGGQVPLGAPPPFPTWPGCPQPPPLHAWQAGTPPPSPQPAAFQPS- SLGTPTPSWPGCPQ--IPSHPQGGTPVFYSPQPPSFQPPCFQPPSFQPPSFPLPP * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	LPFPQSPAFTASPAPPQSPGLQPLIHHAQMVQLGLNNHMMWNQRGSQAPEDKTQEAE-- VSSPQSQSFPSSAPPQTPGPQPLIHHAQMVQLGVNNHMMWGHTGAQSSDDKTECSEN : . * * * : * : * . * : * : * . * . * . * . * . * : * : * : * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	----- CMGPLTDQGEPLLETPG

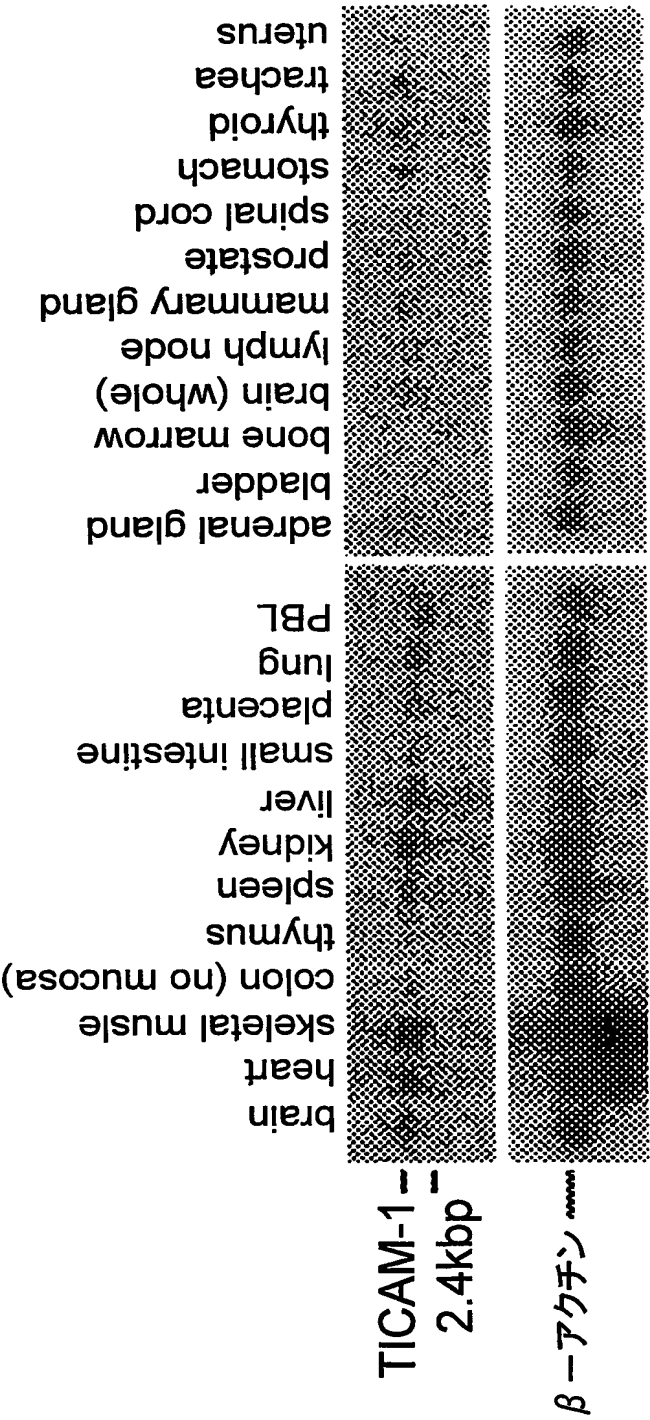
■  
 ■ ■  
 ■  
 ■ ■  
 ■ ■  
 ■ ■

\*  
 \*

..  
\*\*

**BOX3**

図 7



7/16

図 8

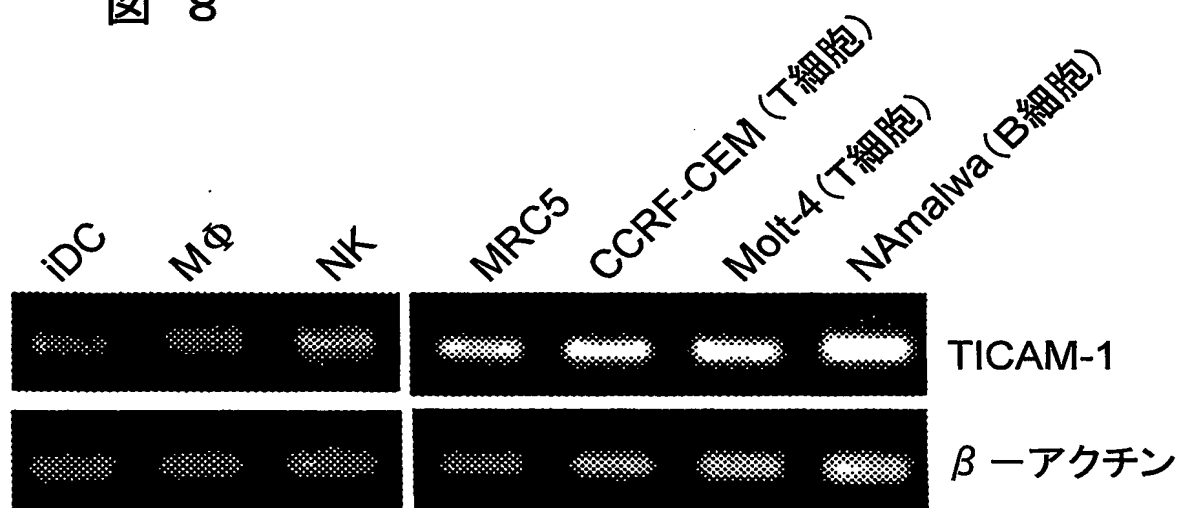
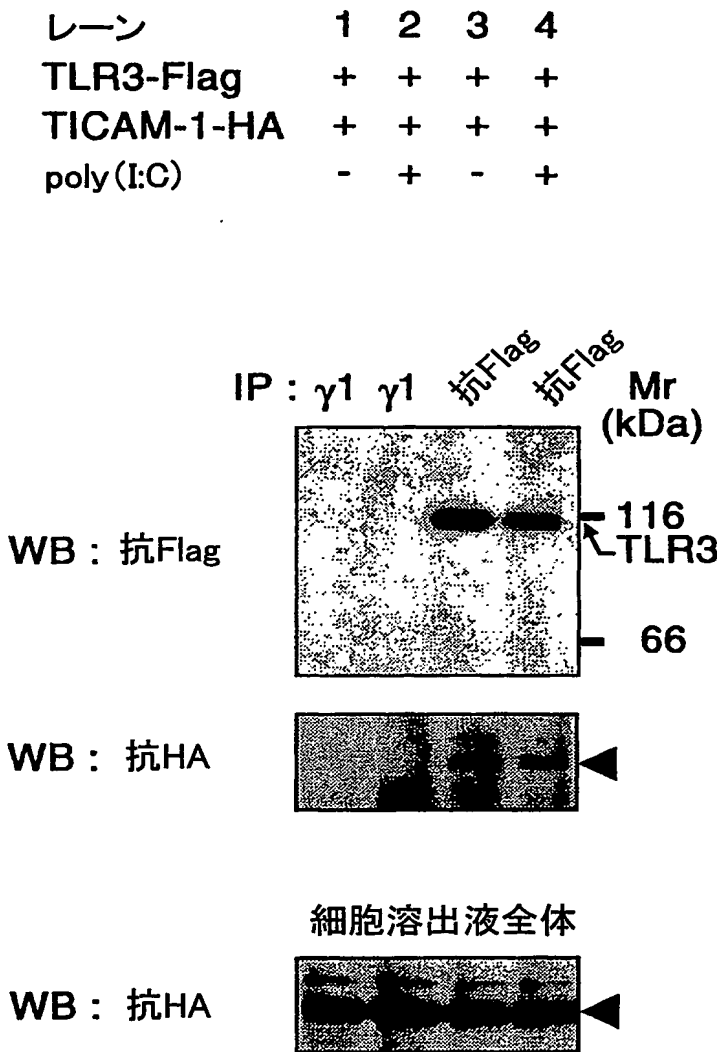
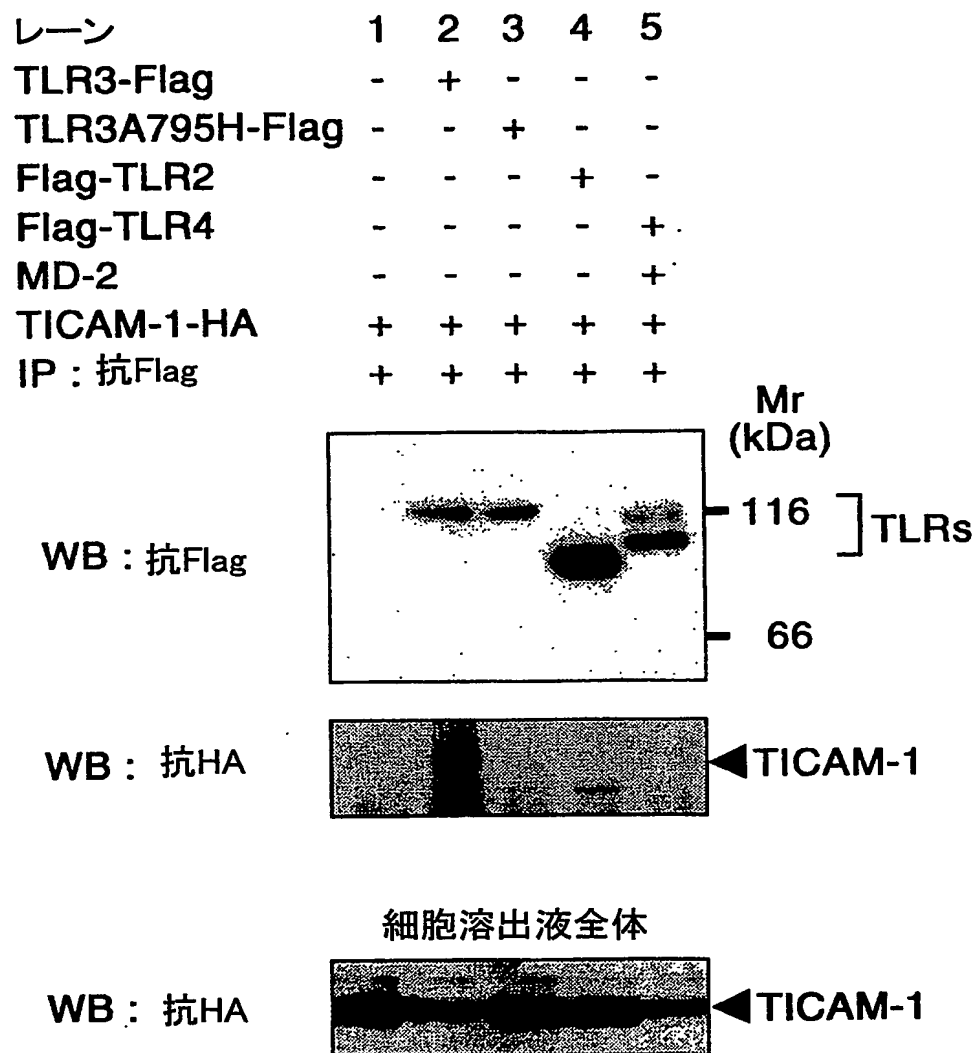


図 9



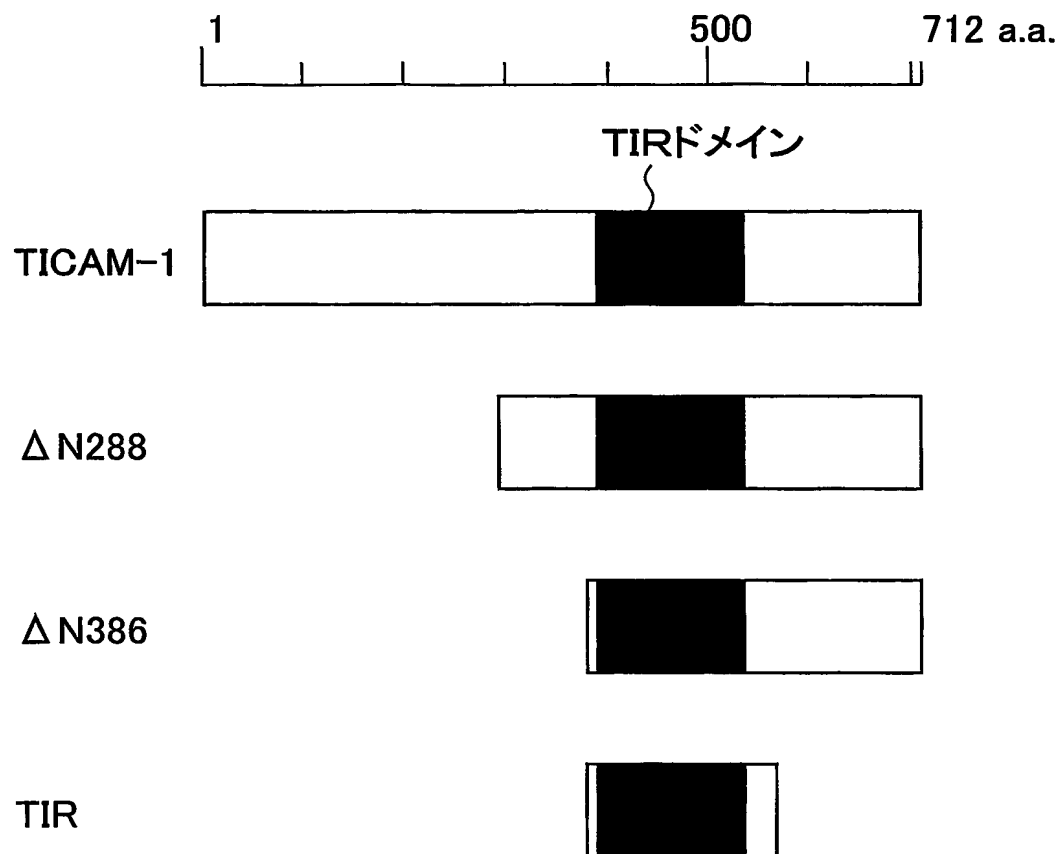
9/16

図 10

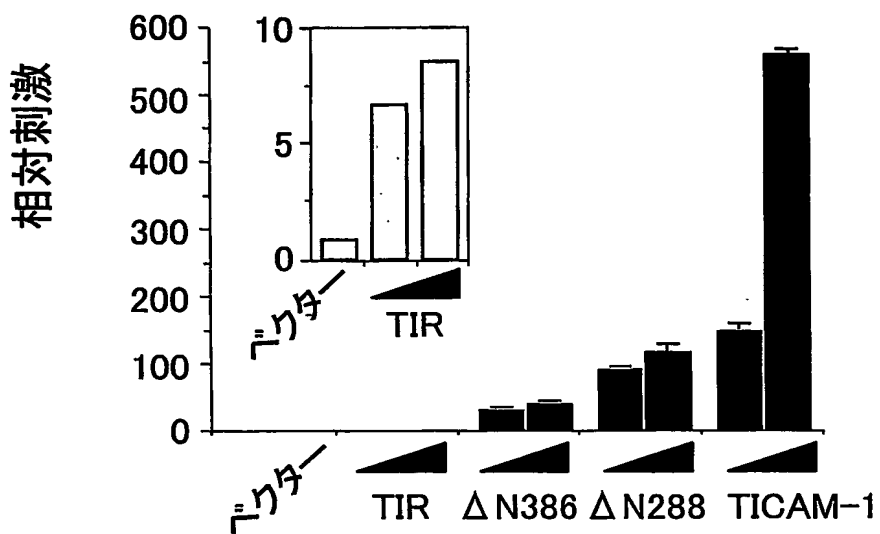
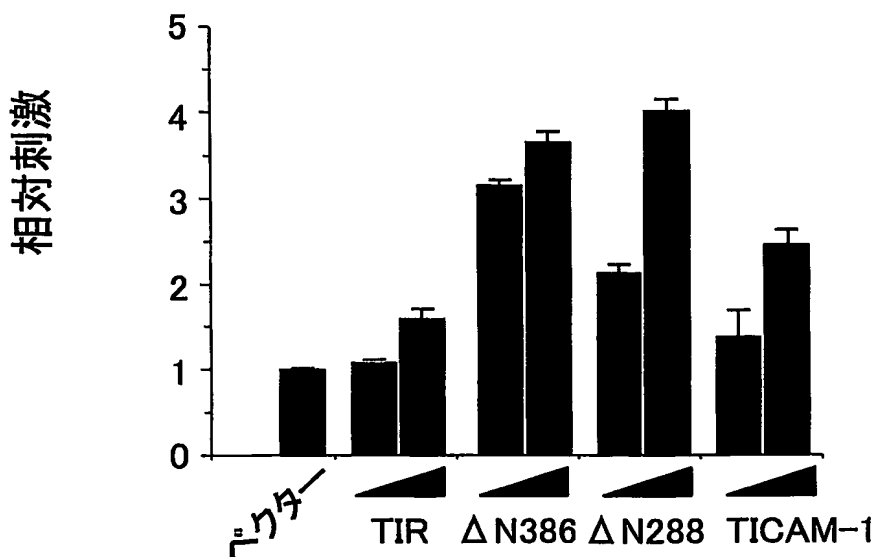


10/16

図 11



11/16

図 12 (a) インターフェロン  $\beta$ 図 12 (b) NF- $\kappa$ B



12/16

図 13 (a)

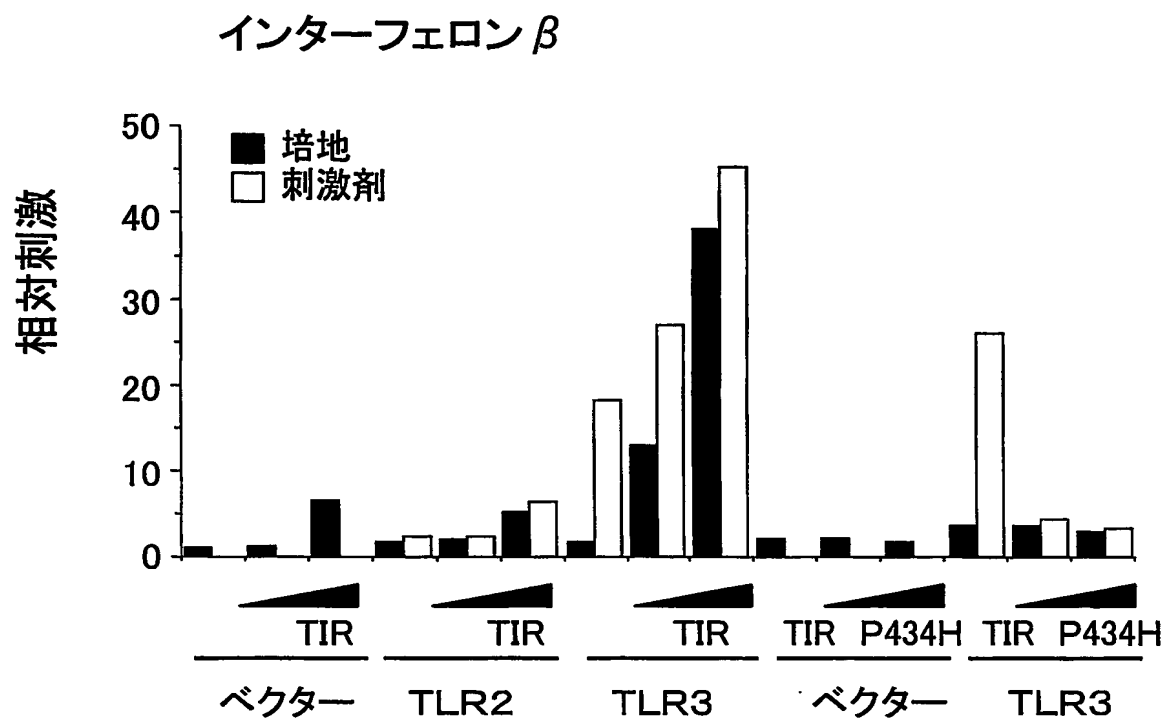
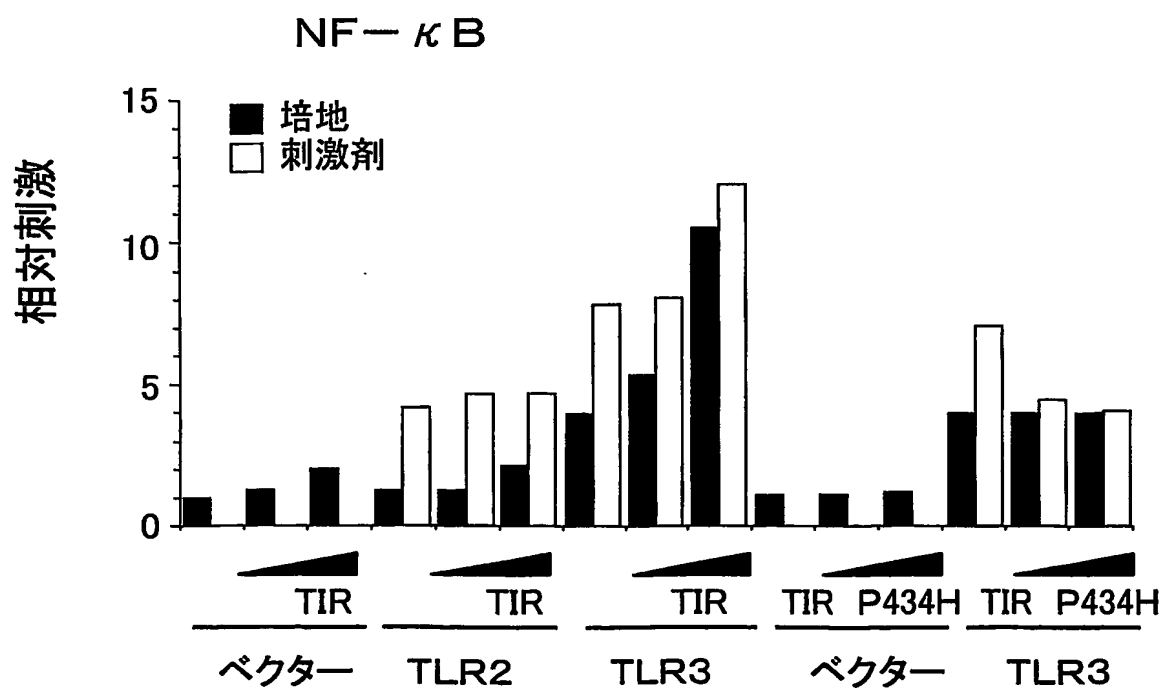


図 13 (b)



13/16

図 14 (a)

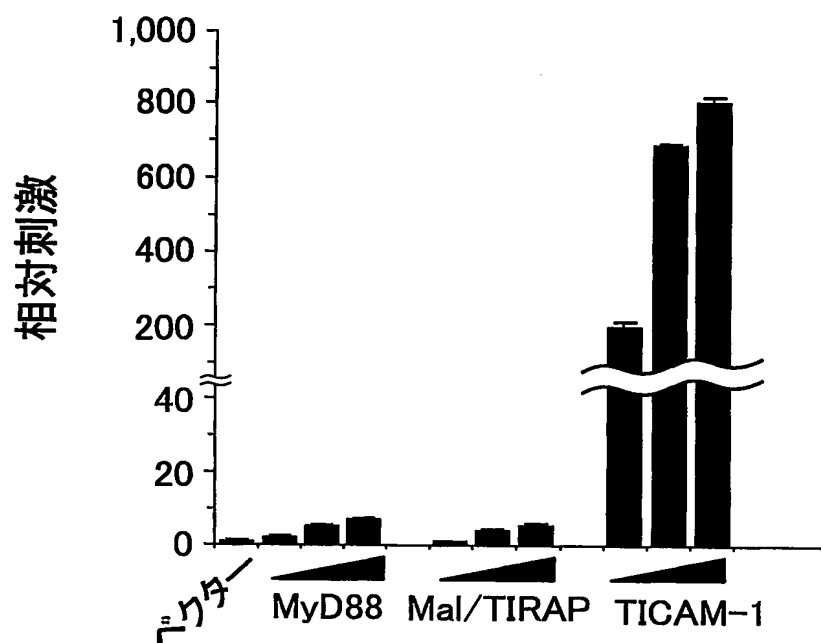
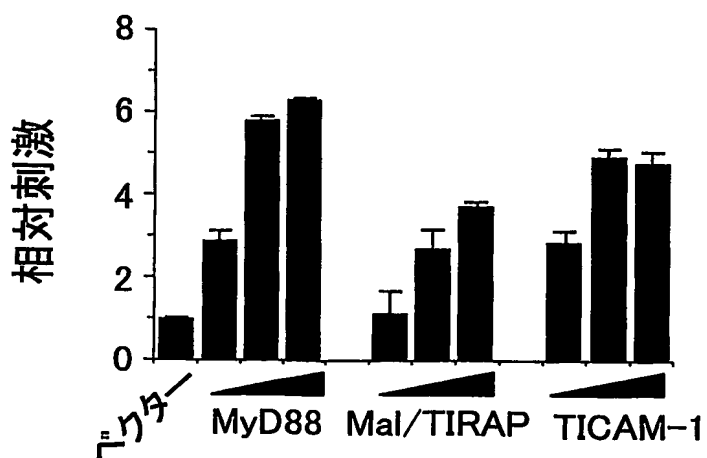
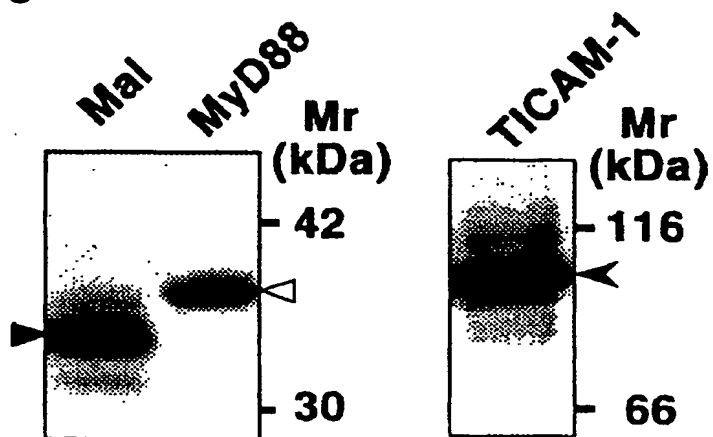
インターフェロン  $\beta$ 

図 14 (b)

NF- $\kappa$ B

14/16

図 15



WB : 抗HA

図 16

TICAM-1 センス : r(GAC CAG ACG CCA CUC CAA C)d(TT)  
TICAM-1 アンチセンス : r(GUU GGA GUG GCG UCU GGU C)d(TT)

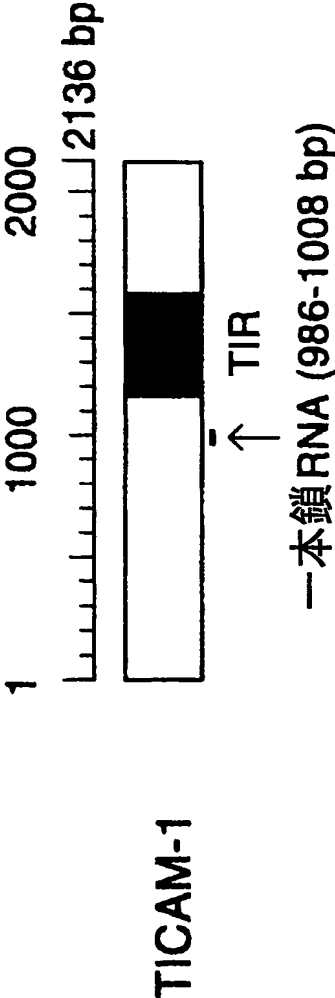


図 17 (a)

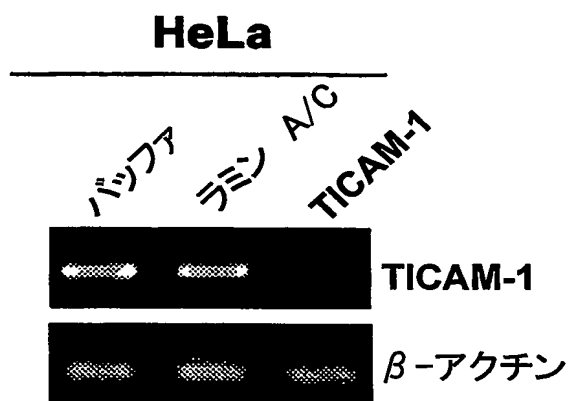


図 17 (b)

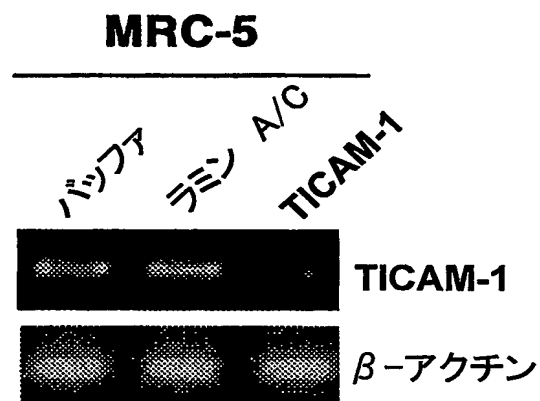


図 18 (a)

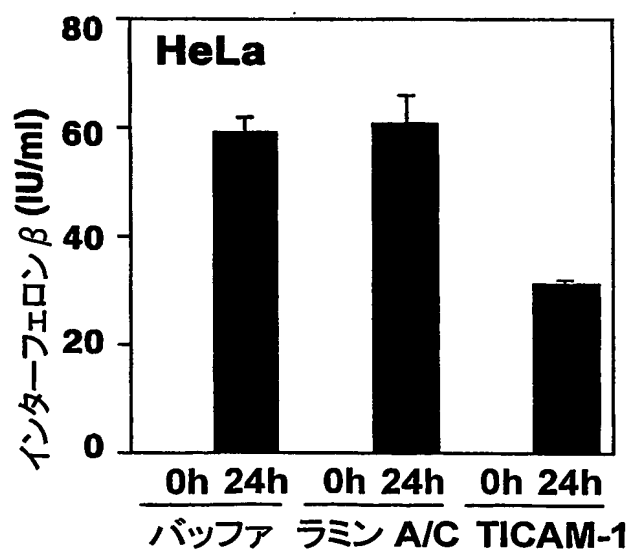
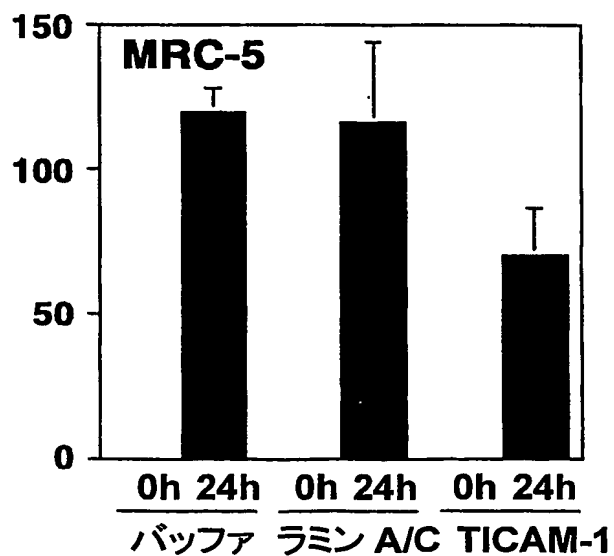


図 18 (b)



## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> Novel Apaptor Protein capable of binding Mammal Toll-Like Rceptor 3

<130> A211-02/PCT

<150> JP 2002-349015

<151> 2002-11-29

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2460

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (63)..(2198)

<400> 1

gtgtggaaca tgccttcacc acctccagct tctgctgccg gaggctgcac ccacctgtgc 60

cc atg gcc tgc aca ggc cca tca ctt cct agc gcc ttc gac att cta 107

Met Ala Cys Thr Gly Pro Ser Leu Pro Ser Ala Phe Asp Ile Leu

2/25

1	5	10	15	
ggt gca gca ggc cag gac aag ctc ttg tat ctg aag cac aaa ctg aag				155
Gly Ala Ala Gly Gln Asp Lys Leu Leu Tyr Leu Lys His Lys Leu Lys				
	20	25	30	
acc cca cgc cca ggc tgc cag ggg cag gac ctc ctg cat gcc atg gtt				203
Thr Pro Arg Pro Gly Cys Gln Gly Gln Asp Leu Leu His Ala Met Val				
	35	40	45	
ctc ctg aag ctg ggc cag gaa act gag gcc agg atc tct cta gag gca				251
Leu Leu Lys Leu Gly Gln Glu Thr Glu Ala Arg Ile Ser Leu Glu Ala				
	50	55	60	
ttg aag gcc gat gcg gtg gcc cgg ctg gtg gcc cgc cag tgg gct ggc				299
Leu Lys Ala Asp Ala Val Ala Arg Leu Val Ala Arg Gln Trp Ala Gly				
	65	70	75	
gtg gac agc acc gag gac cca gag gag ccc cca gat gtg tcc tgg gct				347
Val Asp Ser Thr Glu Asp Pro Glu Glu Pro Pro Asp Val Ser Trp Ala				
	80	85	90	95
gtg gcc cgc ttg tac cac ctg ctg gct gag gag aag ctg tgc ccc gcc				395
Val Ala Arg Leu Tyr His Leu Leu Ala Glu Glu Lys Leu Cys Pro Ala				
	100	105	110	
tcg ctg cgg gac gtg gcc tac cag gaa gcc gtc cgc acc ctc agc tcc				443
Ser Leu Arg Asp Val Ala Tyr Gln Glu Ala Val Arg Thr Leu Ser Ser				
	115	120	125	

agg gac gac cac cgg ctg ggg gaa ctt cag gat gag gcc cga aac cgg 491

Arg Asp Asp His Arg Leu Gly Glu Leu Gln Asp Glu Ala Arg Asn Arg

130

135

140

tgt ggg tgg gac att gct ggg gat cca ggg agc atc cgg acg ctc cag 539

Cys Gly Trp Asp Ile Ala Gly Asp Pro Gly Ser Ile Arg Thr Leu Gln

145

150

155

tcc aat ctg ggc tgc ctc cca cca tcc tcg gct ttg ccc tct ggg acc 587

Ser Asn Leu Gly Cys Leu Pro Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Gly Thr

160

165

170

175

agg agc ctc cca cgc ccc att gac ggt gtt tcg gac tgg agc caa ggg 635

Arg Ser Leu Pro Arg Pro Ile Asp Gly Val Ser Asp Trp Ser Gln Gly

180

185

190

tgc tcc ctg cga tcc act ggc agc cct gcc tcc ctg gcc agc aac ttg 683

Cys Ser Leu Arg Ser Thr Gly Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ser Asn Leu

195

200

205

gaa atc agc cag tcc cct acc atg ccc ttc ctc agc ctg cac cgc agc 731

Glu Ile Ser Gln Ser Pro Thr Met Pro Phe Leu Ser Leu His Arg Ser

210

215

220

cca cat ggg ccc agc aag ctc tgt gac gac ccc cag gcc agc ttg gtg 779

Pro His Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asp Asp Pro Gln Ala Ser Leu Val

225

230

235



4/25

ccc gag cct gtc ccc ggt ggc tgc cag gag cct gag gag atg agc tgg 827

Pro Glu Pro Val Pro Gly Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Met Ser Trp

240

245

250

255

ccg cca tcg ggg gag att gcc agc cca cca gag ctg cca agc agc cca 875

Pro Pro Ser Gly Glu Ile Ala Ser Pro Pro Glu Leu Pro Ser Ser Pro

260

265

270

cct cct ggg ctt ccc gaa gtg gcc cca gat gca acc tcc act ggc ctc 923

Pro Pro Gly Leu Pro Glu Val Ala Pro Asp Ala Thr Ser Thr Gly Leu

275

280

285

cct gat acc ccc gca gct cca gaa acc agc acc aac tac cca gtg gag 971

Pro Asp Thr Pro Ala Ala Pro Glu Thr Ser Thr Asn Tyr Pro Val Glu

290

295

300

tgc acc gag ggg tct gca ggc ccc cag tct ctc ccc ttg cct att ctg 1019

Cys Thr Glu Gly Ser Ala Gly Pro Gln Ser Leu Pro Leu Pro Ile Leu

305

310

315

gag ccg gtc aaa aac ccc tgc tct gtc aaa gac cag acg cca ctc caa 1067

Glu Pro Val Lys Asn Pro Cys Ser Val Lys Asp Gln Thr Pro Leu Gln

320

325

330

335

ctt tct gta gaa gat acc acc tct cca aat acc aag ccg tgc cca cct 1115

Leu Ser Val Glu Asp Thr Thr Ser Pro Asn Thr Lys Pro Cys Pro Pro

340

345

350

act ccc acc acc cca gaa aca tcc cct cct cct cct cct cct cct 1163

5/25

Thr Pro Thr Thr Pro Glu Thr Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro

355

360

365

tca tct act cct tgt tca gct cac ctg acc ccc tcc tcc ctg ttc cct 1211

Ser Ser Thr Pro Cys Ser Ala His Leu Thr Pro Ser Ser Leu Phe Pro

370

375

380

tcc tcc ctg gaa tca tca tcg gaa cag aaa ttc tat aac ttt gtg atc 1259

Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ser Glu Gln Lys Phe Tyr Asn Phe Val Ile

385

390

395

ctc cac gcc agg gca gac gaa cac atc gcc ctg cgg gtt cgg gag aag 1307

Leu His Ala Arg Ala Asp Glu His Ile Ala Leu Arg Val Arg Glu Lys

400

405

410

415

ctg gag gcc ctt ggc gtg ccc gac ggg gcc acc ttc tgc gag gat ttc 1355

Leu Glu Ala Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu Asp Phe

420

425

430

cag gtg ccg ggg cgc ggg gag ctg agc tgc ctg cag gac gcc ata gac 1403

Gln Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu Ser Cys Leu Gln Asp Ala Ile Asp

435

440

445

cac tca gct ttc atc atc cta ctt ctc acc tcc aac ttc gac tgt cgc 1451

His Ser Ala Phe Ile Ile Leu Leu Leu Thr Ser Asn Phe Asp Cys Arg

450

455

460

ctg agc ctg cac cag gtg aac caa gcc atg atg agc aac ctc acg cga 1499

Leu Ser Leu His Gln Val Asn Gln Ala Met Met Ser Asn Leu Thr Arg

6/25

465	470	475	
cag ggg tcg cca gac tgt gtc atc ccc ttc ctg ccc ctg gag agc tcc 1547			
Gln Gly Ser Pro Asp Cys Val Ile Pro Phe Leu Pro Leu Glu Ser Ser			
480	485	490	495
ccg gcc cag ctc agc tcc gac acg gcc agc ctg ctc tcc ggg ctg gtg 1595			
Pro Ala Gln Leu Ser Ser Asp Thr Ala Ser Leu Leu Ser Gly Leu Val			
	500	505	510
cgg ctg gac gaa cac tcc cag atc ttc gcc agg aag gtg gcc aac acc 1643			
Arg Leu Asp Glu His Ser Gln Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala Asn Thr			
	515	520	525
ttc aag ccc cac agg ctt cag gcc cga aag gcc atg tgg agg aag gaa 1691			
Phe Lys Pro His Arg Leu Gln Ala Arg Lys Ala Met Trp Arg Lys Glu			
	530	535	540
cag gac acc cga gcc ctg cgg gaa cag agc caa cac ctg gac ggt gag 1739			
Gln Asp Thr Arg Ala Leu Arg Glu Gln Ser Gln His Leu Asp Gly Glu			
	545	550	555
cgg atg cag gcg gcg gca ctg aac gca gcc tac tca gcc tac ctc cag 1787			
Arg Met Gln Ala Ala Ala Leu Asn Ala Ala Tyr Ser Ala Tyr Leu Gln			
560	565	570	575
agc tac ttg tcc tac cag gca cag atg gag cag ctc cag gtg gct ttt 1835			
Ser Tyr Leu Ser Tyr Gln Ala Gln Met Glu Gln Leu Gln Val Ala Phe			
	580	585	590

7/25

ggg agc cac atg tca ttt ggg act ggg gcg ccc tat ggg gct cga atg 1883

Gly Ser His Met Ser Phe Gly Thr Gly Ala Pro Tyr Gly Ala Arg Met

595

600

605

ccc ttt ggg ggc cag gtg ccc ctg gga gcc ccg cca ccc ttt ccc act 1931

Pro Phe Gly Gly Gln Val Pro Leu Gly Ala Pro Pro Pro Phe Pro Thr

610

615

620

tgg ccg ggg tgc ccg cag ccg cca ccc ctg cac gca tgg cag gct ggc 1979

Trp Pro Gly Cys Pro Gln Pro Pro Pro Leu His Ala Trp Gln Ala Gly

625

630

635

acc ccc cca ccg ccc tcc cca cag cca gca gcc ttt cca cag tca ctg 2027

Thr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Ala Phe Pro Gln Ser Leu

640

645

650

655

ccc ttc ccg cag tcc cca gcc ttc cct acg gcc tca ccc gca ccc cct 2075

Pro Phe Pro Gln Ser Pro Ala Phe Pro Thr Ala Ser Pro Ala Pro Pro

660

665

670

cag agc cca ggg ctg caa ccc ctc att atc cac cac gca cag atg gta 2123

Gln Ser Pro Gly Leu Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met Val

675

680

685

cag ctg ggg ctg aac aac cac atg tgg aac cag aga ggg tcc cag gcg 2171

Gln Leu Gly Leu Asn Asn His Met Trp Asn Gln Arg Gly Ser Gln Ala

690

695

700

8/25

ccc gag gac aag acg cag gag gca gaa tgaccgcgtg tccttgcctg 2218

Pro Glu Asp Lys Thr Gln Glu Ala Glu

705

710

accacctggg gaacaccctt ggacccaggc atcggccagg accccataga gcaccccggt 2278

ctgccctgtg ccctgtggac agtggaagat gaggtcatct gccactttca ggacattgtc 2338

cgggagccct tcatttagga caaaacgggc gcgatgatgc cctggctttc aggggtggtca 2398

gaactggata cgggtgtttac aattccaatc tctctatttc tgggtgaagg gtcttggttg 2458

tg

2460

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 712

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ala Cys Thr Gly Pro Ser Leu Pro Ser Ala Phe Asp Ile Leu Gly

1

5

10

15

Ala Ala Gly Gln Asp Lys Leu Leu Tyr Leu Lys His Lys Leu Lys Thr

20

25

30

Pro Arg Pro Gly Cys Gln Gly Gln Asp Leu Leu His Ala Met Val Leu

35

40

45

9/25

Leu Lys Leu Gly Gln Glu Thr Glu Ala Arg Ile Ser Leu Glu Ala Leu

50

55

60

Lys Ala Asp Ala Val Ala Arg Leu Val Ala Arg Gln Trp Ala Gly Val

65

70

75

80

Asp Ser Thr Glu Asp Pro Glu Glu Pro Pro Asp Val Ser Trp Ala Val

85

90

95

Ala Arg Leu Tyr His Leu Leu Ala Glu Glu Lys Leu Cys Pro Ala Ser

100

105

110

Leu Arg Asp Val Ala Tyr Gln Glu Ala Val Arg Thr Leu Ser Ser Arg

115

120

125

Asp Asp His Arg Leu Gly Glu Leu Gln Asp Glu Ala Arg Asn Arg Cys

130

135

140

Gly Trp Asp Ile Ala Gly Asp Pro Gly Ser Ile Arg Thr Leu Gln Ser

145

150

155

160

Asn Leu Gly Cys Leu Pro Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Gly Thr Arg

165

170

175

Ser Leu Pro Arg Pro Ile Asp Gly Val Ser Asp Trp Ser Gln Gly Cys

180

185

190

Ser Leu Arg Ser Thr Gly Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ser Asn Leu Glu

10/25

195

200

205

Ile Ser Gln Ser Pro Thr Met Pro Phe Leu Ser Leu His Arg Ser Pro

210

215

220

His Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asp Asp Pro Gln Ala Ser Leu Val Pro

225

230

235

240

Glu Pro Val Pro Gly Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Met Ser Trp Pro

245

250

255

Pro Ser Gly Glu Ile Ala Ser Pro Pro Glu Leu Pro Ser Ser Pro Pro

260

265

270

Pro Gly Leu Pro Glu Val Ala Pro Asp Ala Thr Ser Thr Gly Leu Pro

275

280

285

Asp Thr Pro Ala Ala Pro Glu Thr Ser Thr Asn Tyr Pro Val Glu Cys

290

295

300

Thr Glu Gly Ser Ala Gly Pro Gln Ser Leu Pro Leu Pro Ile Leu Glu

305

310

315

320

Pro Val Lys Asn Pro Cys Ser Val Lys Asp Gln Thr Pro Leu Gln Leu

325

330

335

Ser Val Glu Asp Thr Thr Ser Pro Asn Thr Lys Pro Cys Pro Pro Thr

340

345

350

11/25

Pro Thr Thr Pro Glu Thr Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser

355

360

365

Ser Thr Pro Cys Ser Ala His Leu Thr Pro Ser Ser Leu Phe Pro Ser

370

375

380

Ser Leu Glu Ser Ser Ser Glu Gln Lys Phe Tyr Asn Phe Val Ile Leu

385

390

395

400

His Ala Arg Ala Asp Glu His Ile Ala Leu Arg Val Arg Glu Lys Leu

405

410

415

Glu Ala Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu Asp Phe Gln

420

425

430

Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu Ser Cys Leu Gln Asp Ala Ile Asp His

435

440

445

Ser Ala Phe Ile Ile Leu Leu Leu Thr Ser Asn Phe Asp Cys Arg Leu

450

455

460

Ser Leu His Gln Val Asn Gln Ala Met Met Ser Asn Leu Thr Arg Gln

465

470

475

480

Gly Ser Pro Asp Cys Val Ile Pro Phe Leu Pro Leu Glu Ser Ser Pro

485

490

495

Ala Gln Leu Ser Ser Asp Thr Ala Ser Leu Leu Ser Gly Leu Val Arg

500

505

510



12/25

Leu Asp Glu His Ser Gln Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala Asn Thr Phe

515

520

525

Lys Pro His Arg Leu Gln Ala Arg Lys Ala Met Trp Arg Lys Glu Gln

530

535

540

Asp Thr Arg Ala Leu Arg Glu Gln Ser Gln His Leu Asp Gly Glu Arg

545

550

555

560

Met Gln Ala Ala Ala Leu Asn Ala Ala Tyr Ser Ala Tyr Leu Gln Ser

565

570

575

Tyr Leu Ser Tyr Gln Ala Gln Met Glu Gln Leu Gln Val Ala Phe Gly

580

585

590

Ser His Met Ser Phe Gly Thr Gly Ala Pro Tyr Gly Ala Arg Met Pro

595

600

605

Phe Gly Gly Gln Val Pro Leu Gly Ala Pro Pro Pro Phe Pro Thr Trp

610

615

620

Pro Gly Cys Pro Gln Pro Pro Pro Leu His Ala Trp Gln Ala Gly Thr

625

630

635

640

Pro Pro Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Ala Phe Pro Gln Ser Leu Pro

645

650

655

Phe Pro Gln Ser Pro Ala Phe Pro Thr Ala Ser Pro Ala Pro Pro Gln

13/25

660

665

670

Ser Pro Gly Leu Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met Val Gln

675

680

685

Leu Gly Leu Asn Asn His Met Trp Asn Gln Arg Gly Ser Gln Ala Pro

690

695

700

Glu Asp Lys Thr Gln Glu Ala Glu

705

710

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2299

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (66)..(2261)

&lt;400&gt; 3

tcggttcgga acatgtctcc acccacccca ccctctgtgg ctccaggctt cattctcccc 60

catcc atg gat aac cca ggg cct tcg ctc cgt ggt gcc ttt ggc att cta 110

Met Asp Asn Pro Gly Pro Ser Leu Arg Gly Ala Phe Gly Ile Leu

1

5

10

15

14/25

ggt gcc ttg gaa agg gac agg ctg acc cac ctg aaa cac aag ctg ggg 158

Gly Ala Leu Glu Arg Asp Arg Leu Thr His Leu Lys His Lys Leu Gly

20

25

30

agt ctg tgt tca ggc agc cag gag tca aag ctt ctc cat gcc atg gta 206

Ser Leu Cys Ser Gly Ser Gln Glu Ser Lys Leu Leu His Ala Met Val

35

40

45

ctc ctg gct ctg ggc cag gac acg gag gcc agg gtc tct ctg gag tcc 254

Leu Leu Ala Leu Gly Gln Asp Thr Glu Ala Arg Val Ser Leu Glu Ser

50

55

60

ttg aag atg aac aca gta gcc cag ctg gta gcc cac cag tgg gca gac 302

Leu Lys Met Asn Thr Val Ala Gln Leu Val Ala His Gln Trp Ala Asp

65

70

75

atg gag acc aca gag ggc cct gag gag cct cca gac ttg tcc tgg acg 350

Met Glu Thr Thr Glu Gly Pro Glu Glu Pro Pro Asp Leu Ser Trp Thr

80

85

90

95

gtg gct cgc ctg tac cac ctg ctg gct gag gag aac ctg tgt ccg gcc 398

Val Ala Arg Leu Tyr His Leu Leu Ala Glu Glu Asn Leu Cys Pro Ala

100

105

110

tcc aca agg gac atg gct tac cag gtg gcc ctt cgt gac ttt gcc tcc 446

Ser Thr Arg Asp Met Ala Tyr Gln Val Ala Leu Arg Asp Phe Ala Ser

115

120

125

cag ggt gac cac cag ctg ggc caa ctc cag aat gag gcc tgg gat cgg 494

15/25

Gln Gly Asp His Gln Leu Gly Gln Leu Gln Asn Glu Ala Trp Asp Arg

130

135

140

tgc agt tca gat atc aag ggg gac ccc agt ggt ttc cag cca ctc cat 542

Cys Ser Ser Asp Ile Lys Gly Asp Pro Ser Gly Phe Gln Pro Leu His

145

150

155

tct cat cag ggt tcc ctg cag cca cct tca gca tcc cct gca gtg acc 590

Ser His Gln Gly Ser Leu Gln Pro Pro Ser Ala Ser Pro Ala Val Thr

160

165

170

175

aga agc cag cct cgt ccc att gac aca cca gac tgg agt tgg gga cat 638

Arg Ser Gln Pro Arg Pro Ile Asp Thr Pro Asp Trp Ser Trp Gly His

180

185

190

acg tta cac tcc acc aac agc act gcc tca ctg gcc agc cac cta gag 686

Thr Leu His Ser Thr Asn Ser Thr Ala Ser Leu Ala Ser His Leu Glu

195

200

205

atc agc cag tca ccc act ctt gcc ttt ctc tct tca cac cat gga acc 734

Ile Ser Gln Ser Pro Thr Leu Ala Phe Leu Ser Ser His His Gly Thr

210

215

220

cat ggg ccc agc aag cta tgt aac aca ccg ctg gac act cag gag cct 782

His Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asn Thr Pro Leu Asp Thr Gln Glu Pro

225

230

235

cag ctt gtc cct gaa ggc tgc caa gaa cct gag gag ata agc tgg cct 830

Gln Leu Val Pro Glu Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Ile Ser Trp Pro

16/25

240	245	250	255
cca tca gtg gag acc agt gtc tcc tta ggg tta cca cac gaa att agc 878			
Pro Ser Val Glu Thr Ser Val Ser Leu Gly Leu Pro His Glu Ile Ser			
260	265	270	
gtt cca gag gtg tct cca gag gag gct tcg ccc atc ctc cct gac gcc 926			
Val Pro Glu Val Ser Pro Glu Glu Ala Ser Pro Ile Leu Pro Asp Ala			
275	280	285	
ctg gct gct cca gac aca agt gtc cac tgt ccc att gaa tgc aca gag 974			
Leu Ala Ala Pro Asp Thr Ser Val His Cys Pro Ile Glu Cys Thr Glu			
290	295	300	
ttg tct aca aac tcc agg tct ccc ctg acg tcc acc aca gaa agt gtt 1022			
Leu Ser Thr Asn Ser Arg Ser Pro Leu Thr Ser Thr Thr Glu Ser Val			
305	310	315	
gga aag cag tgg cct att aca agt cag agg tca cct cag gtt cct gta 1070			
Gly Lys Gln Trp Pro Ile Thr Ser Gln Arg Ser Pro Gln Val Pro Val			
320	325	330	335
gga gat gat tct ctg cag aac acc acg tca tcc agc cct cct gcc cag 1118			
Gly Asp Asp Ser Leu Gln Asn Thr Thr Ser Ser Ser Pro Pro Ala Gln			
340	345	350	
cca cca tcc ctc caa gcc tcc cct aag ctg cct cct tcc cct ctg tcc 1166			
Pro Pro Ser Leu Gln Ala Ser Pro Lys Leu Pro Pro Ser Pro Leu Ser			
355	360	365	

17/25

tct gct tcc tcc ccg agc agc tac cct gct cct cca acc tcc aca tcc 1214

Ser Ala Ser Ser Pro Ser Ser Tyr Pro Ala Pro Pro Thr Ser Thr Ser

370

375

380

cct gtt ttg gac cac tca gaa aca tct gat cag aaa ttc tat aac ttt 1262

Pro Val Leu Asp His Ser Glu Thr Ser Asp Gln Lys Phe Tyr Asn Phe

385

390

395

gtg gtt atc cat gcc agg gct gat gaa cag gtg gcc cta cgt att cgg 1310

Val Val Ile His Ala Arg Ala Asp Glu Gln Val Ala Leu Arg Ile Arg

400

405

410

415

gag aag ctg gag acc ctc ggg gta cct gac ggg gcc acc ttc tgt gag 1358

Glu Lys Leu Glu Thr Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu

420

425

430

gaa ttt cag gtg ccc ggg cgt ggt gag ctg cac tgt ctc caa gat gcc 1406

Glu Phe Gln Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu His Cys Leu Gln Asp Ala

435

440

445

atc gat cac tcg ggg ttc acg atc ctg ctc ctg act gct agc ttt gat 1454

Ile Asp His Ser Gly Phe Thr Ile Leu Leu Leu Thr Ala Ser Phe Asp

450

455

460

tgc agc ctg agc ctg cat caa atc aac cat gct ctc atg aac agc ctt 1502

Cys Ser Leu Ser Leu His Gln Ile Asn His Ala Leu Met Asn Ser Leu

465

470

475

18/25

aca cag tct ggg agg cag gac tgt gtg atc ccc ctc ctc cca ctt gag 1550

Thr Gln Ser Gly Arg Gln Asp Cys Val Ile Pro Leu Leu Pro Leu Glu

480

485

490

495

tgt tct cag gcc cag ctc agc cca gat aca acc aga ctg ctc cac agc 1598

Cys Ser Gln Ala Gln Leu Ser Pro Asp Thr Thr Arg Leu Leu His Ser

500

505

510

att gtg tgg ctg gat gaa cac tcc cca atc ttc gcc aga aag gtg gca 1646

Ile Val Trp Leu Asp Glu His Ser Pro Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala

515

520

525

aac acc ttc aag aca cag aag ctc cag gca cag cgg gta cgc tgg aag 1694

Asn Thr Phe Lys Thr Gln Lys Leu Gln Ala Gln Arg Val Arg Trp Lys

530

535

540

aaa gcg cag gag gcc aga acc ctc aag gag cag agc ata cag ctg gag 1742

Lys Ala Gln Glu Ala Arg Thr Leu Lys Glu Gln Ser Ile Gln Leu Glu

545

550

555

gca gag cgg caa aac gtg gca gcc ata tct gct gcc tac aca gcc tat 1790

Ala Glu Arg Gln Asn Val Ala Ala Ile Ser Ala Ala Tyr Thr Ala Tyr

560

565

570

575

gtc cat agc tat agg gcc tgg caa gca gag atg aac aaa ctt ggg gtg 1838

Val His Ser Tyr Arg Ala Trp Gln Ala Glu Met Asn Lys Leu Gly Val

580

585

590

gct ttt ggg aag aac ttg tca ctg ggg act cca aca ccc agc tgg ccc 1886

19/25

Ala Phe Gly Lys Asn Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Pro Ser Trp Pro

595

600

605

gga tgt cca cag cca ata cct tct cat cct cag ggt ggt act cca gtt 1934

Gly Cys Pro Gln Pro Ile Pro Ser His Pro Gln Gly Gly Thr Pro Val

610

615

620

ttc ccc tat tcc cca cag cct cca tcc ttc cct cag cct cca tgc ttc 1982

Phe Pro Tyr Ser Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Cys Phe

625

630

635

cct cag cct cca tcc ttc cct cag cct cca tcc ttc cca ctg cct cca 2030

Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Leu Pro Pro

640

645

650

655

gtc tct tcc cca cag tcc caa tcc ttt cca tca gcc tcc tcc cca gcc 2078

Val Ser Ser Pro Gln Ser Gln Ser Phe Pro Ser Ala Ser Ser Pro Ala

660

665

670

cca cag act cca gga cct cag cct ctc att att cac cat gcc cag atg 2126

Pro Gln Thr Pro Gly Pro Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met

675

680

685

gtt cag ctg ggt gtc aac aat cac atg tgg ggc cac aca ggg gcc cag 2174

Val Gln Leu Gly Val Asn Asn His Met Trp Gly His Thr Gly Ala Gln

690

695

700

tca tct gat gac aag act gag tgt tcg gag aac ccc tgt atg ggc cct 2222

Ser Ser Asp Asp Lys Thr Glu Cys Ser Glu Asn Pro Cys Met Gly Pro



20/25

705

710

715

ctg act gat cag ggc gaa ccc ctt ctt gag act cca gag tgaccagggtt 2271

Leu Thr Asp Gln Gly Glu Pro Leu Leu Glu Thr Pro Glu

720

725

730

ggaccccacc tagatggcta gagtgaca

2299

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 732

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 4

Met Asp Asn Pro Gly Pro Ser Leu Arg Gly Ala Phe Gly Ile Leu Gly

1

5

10

15

Ala Leu Glu Arg Asp Arg Leu Thr His Leu Lys His Lys Leu Gly Ser

20

25

30

Leu Cys Ser Gly Ser Gln Glu Ser Lys Leu Leu His Ala Met Val Leu

35

40

45

Leu Ala Leu Gly Gln Asp Thr Glu Ala Arg Val Ser Leu Glu Ser Leu

50

55

60

Lys Met Asn Thr Val Ala Gln Leu Val Ala His Gln Trp Ala Asp Met

65

70

75

80

21/25

Glu Thr Thr Glu Gly Pro Glu Glu Pro Pro Asp Leu Ser Trp Thr Val

85

90

95

Ala Arg Leu Tyr His Leu Leu Ala Glu Glu Asn Leu Cys Pro Ala Ser

100

105

110

Thr Arg Asp Met Ala Tyr Gln Val Ala Leu Arg Asp Phe Ala Ser Gln

115

120

125

Gly Asp His Gln Leu Gly Gln Leu Gln Asn Glu Ala Trp Asp Arg Cys

130

135

140

Ser Ser Asp Ile Lys Gly Asp Pro Ser Gly Phe Gln Pro Leu His Ser

145

150

155

160

His Gln Gly Ser Leu Gln Pro Pro Ser Ala Ser Pro Ala Val Thr Arg

165

170

175

Ser Gln Pro Arg Pro Ile Asp Thr Pro Asp Trp Ser Trp Gly His Thr

180

185

190

Leu His Ser Thr Asn Ser Thr Ala Ser Leu Ala Ser His Leu Glu Ile

195

200

205

Ser Gln Ser Pro Thr Leu Ala Phe Leu Ser Ser His His Gly Thr His

210

215

220

Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asn Thr Pro Leu Asp Thr Gln Glu Pro Gln

22/25

225

230

235

240

Leu Val Pro Glu Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Ile Ser Trp Pro Pro

245

250

255

Ser Val Glu Thr Ser Val Ser Leu Gly Leu Pro His Glu Ile Ser Val

260

265

270

Pro Glu Val Ser Pro Glu Glu Ala Ser Pro Ile Leu Pro Asp Ala Leu

275

280

285

Ala Ala Pro Asp Thr Ser Val His Cys Pro Ile Glu Cys Thr Glu Leu

290

295

300

Ser Thr Asn Ser Arg Ser Pro Leu Thr Ser Thr Thr Glu Ser Val Gly

305

310

315

320

Lys Gln Trp Pro Ile Thr Ser Gln Arg Ser Pro Gln Val Pro Val Gly

325

330

335

Asp Asp Ser Leu Gln Asn Thr Thr Ser Ser Ser Pro Pro Ala Gln Pro

340

345

350

Pro Ser Leu Gln Ala Ser Pro Lys Leu Pro Pro Ser Pro Leu Ser Ser

355

360

365

Ala Ser Ser Pro Ser Ser Tyr Pro Ala Pro Pro Thr Ser Thr Ser Pro

370

375

380

23/25

Val Leu Asp His Ser Glu Thr Ser Asp Gln Lys Phe Tyr Asn Phe Val  
385 390 395 400

Val Ile His Ala Arg Ala Asp Glu Gln Val Ala Leu Arg Ile Arg Glu  
405 410 415

Lys Leu Glu Thr Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu Glu  
420 425 430

Phe Gln Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu His Cys Leu Gln Asp Ala Ile  
435 440 445

Asp His Ser Gly Phe Thr Ile Leu Leu Leu Thr Ala Ser Phe Asp Cys  
450 455 460

Ser Leu Ser Leu His Gln Ile Asn His Ala Leu Met Asn Ser Leu Thr  
465 470 475 480

Gln Ser Gly Arg Gln Asp Cys Val Ile Pro Leu Leu Pro Leu Glu Cys  
485 490 495

Ser Gln Ala Gln Leu Ser Pro Asp Thr Thr Arg Leu Leu His Ser Ile  
500 505 510

Val Trp Leu Asp Glu His Ser Pro Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala Asn  
515 520 525

Thr Phe Lys Thr Gln Lys Leu Gln Ala Gln Arg Val Arg Trp Lys Lys  
530 535 540

24/25

Ala Gln Glu Ala Arg Thr Leu Lys Glu Gln Ser Ile Gln Leu Glu Ala  
545 550 555 560

Glu Arg Gln Asn Val Ala Ala Ile Ser Ala Ala Tyr Thr Ala Tyr Val  
565 570 575

His Ser Tyr Arg Ala Trp Gln Ala Glu Met Asn Lys Leu Gly Val Ala  
580 585 590

Phe Gly Lys Asn Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Pro Ser Trp Pro Gly  
595 600 605

Cys Pro Gln Pro Ile Pro Ser His Pro Gln Gly Gly Thr Pro Val Phe  
610 615 620

Pro Tyr Ser Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Cys Phe Pro  
625 630 635 640

Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Leu Pro Pro Val  
645 650 655

Ser Ser Pro Gln Ser Gln Ser Phe Pro Ser Ala Ser Ser Pro Ala Pro  
660 665 670

Gln Thr Pro Gly Pro Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met Val  
675 680 685

Gln Leu Gly Val Asn Asn His Met Trp Gly His Thr Gly Ala Gln Ser

25/25

690

695

700

Ser Asp Asp Lys Thr Glu Cys Ser Glu Asn Pro Cys Met Gly Pro Leu

705

710

715

720

Thr Asp Gln Gly Glu Pro Leu Leu Glu Thr Pro Glu

725

730

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14854

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08,  
A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P31/12, A61P35/00,  
A61P37/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08,  
A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P31/12, A61P35/00,  
A61P37/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG),  
BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTplus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/053737 A1 (ASAHI KASEI), 11 July, 2002 (11.07.02), & EP 1354950 A1 & US 2003/0143540 A1 & US 2003/0170719 A1 SEQ ID No. 151 to 154	1-22
P, X	OSHIUMI, H. et al., TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction., Nat.Immunol., Vol.4, No.2, Pages 161 to 167. (2003 Feb.)	1-22
A	Alexopoulou, L. et al., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature, Vol.413, No.6857, pages 732 to 738 (2001)	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 December, 2003 (16.12.03)

Date of mailing of the international search report  
13 January, 2004 (13.01.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P31/12, A61P35/00, A61P37/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, C12P21/08, A61K38/17, A61K39/395, A61K48/00, A61P31/12, A61P35/00, A61P37/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq,  
WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)、MEDLINE(STN)、JSTPlus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/053737 A1 (ASAHI KASEI) 2002.07.11 & EP 1354950 A1 & US 2003/0143540 A1 & US 2003/0170719 A1 SEQ ID NO 151-154参照	1-22
P X	Oshiumi, H. et al., TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. Nat Immunol., Vol. 4, No. 2, pp. 161-167. (2003 Feb)	1-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.12.03

国際調査報告の発送日

13.01.04

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

印

4B

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Alexopoulou, L. et al., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature, Vol. 413, No. 6857, pp. 732-738 (2001)	1-22